



TITLE:

湖沼及び沿岸海域に分布する微細藻類溶解性細菌に関する生理生態学的研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

満谷, 淳

CITATION:

満谷, 淳. 湖沼及び沿岸海域に分布する微細藻類溶解性細菌に関する生理生態学的研究. 京都大学, 1996, 博士(農学)

ISSUE DATE:

1996-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3110728>

RIGHT:

湖沼及び沿岸海域に分布する微細藻類溶解性細菌に関する
生理生態学的研究

満谷 淳

1996

目 次

第1章 序 論.....	1
第2章 湖沼に分布する藍藻溶解性滑走細菌の生理生態.....	5
第1節 湖沼における藍藻溶解性細菌の現存量とその季節変動.....	5
第2節 単離した藍藻溶解性細菌の分類学的性状及び宿主特異性.....	14
第3節 <i>Lysobacter</i> sp. LB-1 株の産生する藍藻溶解酵素の分離精製.....	23
第4節 二者培養による藍藻溶解の作用機作の解析.....	33
第5節 摘要.....	47
第3章 沿岸海域に分布する珪藻溶解性細菌の生理生態.....	49
第1節 有明海における従属栄養細菌相の変動.....	50
第2節 有明海における珪藻溶解性細菌の現存量とその季節変動.....	55
第3節 単離した珪藻溶解性細菌の示す珪藻溶解の作用機作.....	67
第4節 摘要.....	80
第4章 総 括.....	82
Summary and conclusions.....	85
謝 辞.....	89
文 献.....	90

第1章 序 論

諏訪湖や霞ヶ浦のような富栄養化の進んだ湖沼においては、春から夏季に様々な藍藻が大増殖して水道水のカビ臭などを引き起こし、社会的な問題ともなっている。沿岸海域においては、ラフィド藻、渦鞭毛藻、珪藻などの赤潮がしばしば発生し、養殖業や魚獲漁業に大きな被害を与えている。このような微細藻類のブルームの発生・消滅のメカニズムについては、従来より光、水温、栄養塩濃度など、藻類の増殖や一次生産に影響を及ぼすと考えられる物理的・化学的側面について長年多くの研究がなされ (Lund *et al.*, 1975 ; 柳ら, 1987 ; 山口, 1994 など), これらの側面からは、かなり解明されてきたと考えられる。しかしながら、ブルームの消長に影響をおよぼす生物学的側面については、水圏中の生物間相互作用が複雑なこともあり、まだまだ不明な点が多い。近年、このような生物学的側面のひとつである微細藻類と細菌との相互関係を解析しようとする試みが多く行われるようになっており、沿岸海域における赤潮の発生・消滅の過程に細菌群が影響を及ぼしていることが明らかにされつつある (Riquelme *et al.*, 1988 ; Fukami *et al.*, 1991)。

アオコや赤潮の発生を抑制するためには、現場水域における栄養塩や有機物の濃度を下げることが有効であるのは明らかである。そのために、現在各種の規制によって汚濁物質の水域への流入が制限されているが、このような対策は、根本的に重要ではあっても、急に効果を示せる性質のものではない。現実には、赤潮が発生し漁業被害が生じている時には、より即効性のある対策が求められており、凝集剤処理 (小島, 1961), 粘土による吸着 (代田, 1977), 過酸化水素処理 (村田ら, 1989)

などの赤潮防除法が考えられてきた。しかしながら、これらについては、水域の生態系を攪乱することによる影響が大きいのではないかという懸念があり、より環境にやさしい対策の開発が求められるところである。

そこで、近年農業の分野では実用段階に入りつつある微生物農薬の考え方を、水圏環境においても応用できないかという考え方が出てきている (石田, 1994a, 1994b ; 今井, 1994)。様々な微生物が藍藻を溶解する能力を持つことは、以前から知られている (Stewart and Daft, 1976, 1977 ; 山本, 1986, 1988)。また、藍藻のブルームが微生物の作用によって突発的に消滅したという事例も報告されている (山本, 1987)。また、近年、沿岸海域からも微細藻類を溶解・殺藻・増殖阻害する活性を示す細菌が次々と見出されている (石田, 1994b)。このような活性を持つ微生物は、「微生物農薬」として利用できる可能性がある。しかしながら、活性があるから撒けば良いというものではなく、それらの利用法を考える以前に、それらを「微生物農薬」として水圏中に投与した場合に周囲の生態系に及ぼす影響について評価しなければならない。その第一段階として、まず水圏中におけるそれらの生理生態について詳しく知る必要がある。

湖沼などの陸水域に生息する藍藻溶解性微生物については、これらを重層寒天平板 (Safferman and Morris, 1963 ; 山本, 1978) を用いて検出するバイオアッセイ法が早くから確立していた。そのため、これまでに、細菌 (Stewart and Brown, 1969 ; Shilo, 1970 ; Daft and Stewart, 1971, Burnham *et al.*, 1981 ; Yamamoto and Suzuki, 1990 など), シアノファージ (Safferman and Morris, 1963 ; Daft *et al.*, 1970 ;

Cannon *et al.*, 1976 ; 前田, 1993), アメーバ (Yamamoto and Suzuki, 1984), 糸状菌 (Canter and Willoughby, 1964 ; Canter, 1972 ; Redhead and Wright, 1978) など, 多様な微生物が藍藻を溶解・殺滅する能力を持つことが, 明らかにされている。中でも藍藻溶解性細菌は報告例が多く, 湖沼における主要な溶解性微生物のひとつであると考えられる。

これまでに報告されている藍藻溶解性細菌には, *Lysobacter* 属 (Shilo, 1970 ; Stewart and Brown, 1971 ; Daft and Stewart, 1971, 1973), *Myxococcus* 属 (Burnham *et al.*, 1981, 1984 ; Daft *et al.*, 1985 ; 山本, 1988 ; Yamamoto and Suzuki, 1990), *Cytophaga* 属 (Stewart and Brown, 1969, 1970), *Flexibacter* 属 (Gromov *et al.*, 1972) などの滑走細菌が多く, 真正細菌は少ない (Burnham *et al.*, 1976 ; Granhall and Berg, 1972 ; Rein *et al.*, 1974 ; Yamamoto *et al.*, 1993)。これらの藍藻溶解性滑走細菌は, 世界各地の湖沼や貯水池, 養殖池, 水路などから単離されていることから, 陸水域に普遍的に分布しているものと考えられる。

藍藻溶解性滑走細菌と藍藻のブルームとの関係を明らかにする目的で, 重層寒天平板法によって, 湖沼や貯水池における藍藻溶解性滑走細菌の現存量が調べられている。その結果, 表層水における藍藻溶解性滑走細菌の現存量とクロロフィル *a* 量との間に有意な相関が見られた (Daft *et al.*, 1975 ; Stewart and Daft, 1977 ; Yamamoto, 1981 ; 山本ら, 1988) ことから, これらの滑走細菌が藍藻のブルームの消滅に関与している可能性が示唆されている。しかしながら一方で, これまでに報告されている藍藻溶解性滑走細菌の現存量である 1ml 当たり 10^3 pfu (plaque forming units) 以下という値が, 単離した藍藻溶解性 *Myxococcus* 属細菌を藍藻とフラスコ内で二者培養した場合

に, 細菌が藍藻を溶解するのに必要とした 10^6 cells/ml という細胞密度と比較するとはるかに低いことから, *Myxococcus* 属細菌は現場の湖沼においてブルームを消滅させるような役割を果たしていないのではないかと, という疑問も提示されている (Fraleigh and Burnham, 1988)。

重層寒天平板法による現存量調査では, 藍藻溶解性滑走細菌の現場における存在量を知ることにはできるが, それらが持つ藍藻溶解活性の大きさを知ることはできない。滑走細菌が藍藻ブルームの消滅に関与しているかどうかを評価するためには, それらが持つ藍藻溶解の作用機作を知る必要がある。そこで, 単離した滑走細菌と無菌培養の藍藻との二者培養によって, 溶解の作用機作を調べる試みが行われてきた。これまでに報告されている作用機作には, 細菌が藍藻の細胞に接触して攻撃を行う (Shilo, 1970 ; Daft and Stewart, 1971, 1973 ; Yamamoto and Suzuki, 1977 ; Burnham *et al.*, 1981, 1984) 場合と, 細胞外に溶解性物質を放出して藍藻の細胞を溶解する (Stewart and Brown, 1971) 場合の 2 つのタイプがある。しかしながら, これらの判定は, 光学顕微鏡下で観察すると細菌が藍藻細胞に接触している様子が観察されるか, されないか, また, 細菌の培養ろ液中に溶解活性が検出されるか, されないか, といった断片的な観察結果から導き出された推論がほとんどである。また, 細菌の産生する藍藻溶解性物質については, 細菌の培養ろ液にリゾチーム様活性が見られるとの報告がなされている (Stewart and Brown, 1970 ; Daft *et al.*, 1985 ; Yamamoto and Suzuki, 1990) もの, いずれも活性の本体は特定されておらず, 溶解性物質が精製された例も見られない。従って, 藍藻溶解性滑走細菌がどのような条件下で, どのような物質を,

藍藻細胞のどのような部位に, どのように作用させて, これを溶解するのかといった, 作用機作の全体像はまだ明らかになってはいない。

以上のように, 藍藻溶解性滑走細菌は, 古くからその存在が知られていたにもかかわらず, 湖沼におけるそれらの生態や, それらの持つ藍藻溶解の作用機作は未だに充分には解明されておらず, それらが果たして藍藻のブルームの消滅に関与しているのかどうかは, 不明である。

一方, 沿岸海域に生息する微細藻類溶解性微生物については, 1980 年代後半までほとんど情報が得られていなかった。1989 年から, 赤潮藻類の増殖や消滅に関与する微生物に関する研究が, 水産庁漁場保全課の大学への委託事業「赤潮対策技術開発試験」において行われたことから, 最近では, 様々な赤潮藻類を溶解, 殺藻, もしくは増殖阻害する細菌が, 日本各地の沿岸海域に広く分布していることが明らかになってきた。*Lysobacter* 属や *Myxococcus* 属などの滑走細菌の報告例が圧倒的に多い陸水域とは異なり, 沿岸海域には, 様々な微細藻類溶解性 (殺藻性という用語が使われている場合も多い) 細菌が生息しているようである。これまでに, 滑走細菌の *Cytophaga* 属 (Imai *et al.*, 1991, 1993 ; 古城, 1992), *Saprospira* 属 (Sakata *et al.*, 1991 ; Sakata and Yasumoto, 1992) 及び *Vitreoscilla* 属 (Sakata and Iwamoto, 1995) 以外にも, 真正細菌の *Vibrio* 属 (Ishio *et al.*, 1989), *Alteromonas* 属 (菅原ら, 1993 ; Imai *et al.*, 1995 ; 坂田, 1994), *Flavobacterium* 属 (Fukami *et al.*, 1992 ; Yoshinaga *et al.*, 1995a) が赤潮藻類溶解・殺藻活性を持つ細菌として単離されている。

沿岸海域におけるこれらの現存量と赤潮との関連性に関する知見はまだそれほど多くは

ないが, *Herterosigma akashiwo* に対する殺藻性細菌が *H. akashiwo* 赤潮の発生に伴って増加し, 赤潮の消滅後もしばらく高密度 (10^2 cells/ml) を維持したのち減少する (今井, 1995) という, 赤潮の消滅に細菌が関与していることを示唆するような調査結果や, 赤潮藻類の密度が増加する時期にはその藻類に対する増殖阻害細菌数が減少し, 逆に赤潮藻類の密度が減少する時期にはその藻類に対する増殖阻害細菌数が増加する (深見と西島, 1994 ; Yoshinaga *et al.*, 1995b) という, 赤潮の発生・消滅過程に細菌が何らかの役割を果たしていることを示唆するような調査結果が, すでに得られている。また, 微細藻類の優占種が *Skeletonema costatum* から *H. akashiwo* に遷移していく時期の海水中には, *S. costatum* などには強い阻害活性を持つが, *H. akashiwo* には阻害効果を示さない細菌が存在する (深見と西島, 1995) という, 微細藻類の遷移過程が細菌によって制御されていることを示唆するような調査結果も得られている。

これらの微細藻類溶解性・殺藻性細菌の示す溶解・殺藻の作用機作については, 藍藻溶解性滑走細菌の場合と同様に, 細菌が宿主に接触して直接攻撃を行う場合 (Imai *et al.*, 1993 ; 坂田, 1994 ; Imai *et al.*, 1995) と, 宿主との接触を必要とせず, 細菌の代謝産物によって溶解・殺藻が起こる場合 (竹内ら, 1992 ; 深見と西島, 1994 ; Imai *et al.*, 1995 ; 坂田, 1995 ; Yoshinaga *et al.*, 1995a) の 2 通りが報告されているが, 溶解・殺藻の過程は完全には解明されていない。また, 溶解性・殺藻性物質については, 高分子のもの (Yoshinaga *et al.*, 1995a) や低分子のもの (竹内ら, 1992 ; 深見と西島, 1994 ; 坂田, 1995) が見出されているが, いずれの物質もまだ分離精製されていない。

第2章 湖沼に分布する藍藻溶解性滑走細菌の生理生態

諏訪湖や霞ヶ浦のような富栄養化の進んだ湖沼においては、春季から夏季に藍藻が大増殖して、水道水のカビ臭、浄水場でのろ過障害、魚の斃死などを引き起こし、社会的な問題ともなっている。また琵琶湖でも近年富栄養化の進行が見られ、夏季におけるアオコの発生や、*Phormidium* 属藍藻に原因する水道水のカビ臭が問題となっている。

このような藍藻のブルームの消長には、光、水温、栄養塩濃度など、藍藻の増殖や一次生産に影響を及ぼすと考えられる物理的・化学的要因のみならず、他の微細藻類や細菌、動物プランクトンなどとの相互関係といった生物学的要因も重要な役割を果たしているものと考えられる。特にブルームの消滅には多様な微生物が関与しているのではないかと考えられている。藍藻を溶解・殺滅する能力を持つ微生物の存在は古くから知られており、中でも滑走細菌に関する報告が多い。しかしながら、藍藻溶解性滑走細菌の生態については、その分布や現存量がクロロフィル a 量のそれらと相関を示すこと (Daft *et al.*, 1975, 山本, 1988; Yamamoto and Suzuki, 1990), その宿主特異性が低いこと (Shilo, 1970; Daft and Stewart, 1971; 山本, 1988; Yamamoto and Suzuki, 1990) などが報告されているが、まだそれほど多くの知見が得られているとは言えず、藍藻溶解性滑走細菌が藍藻ブルームの消滅過程に関与しているのか否かは、未だに明らかではない。滑走細菌による藍藻溶解の機作を培養実験によって調べる試みも行われているが、その殆どが光学もしくは電子顕微鏡下での観察によるもの (Shilo, 1970; Daft and Stewart, 1973; Yamamoto and Suzuki, 1977; Burnham *et al.*, 1981, 1984) であり、無菌培養

の藍藻と細菌との二者培養によって、藍藻の溶解がどのような条件下で起こるのかについて検討した報告は極めて少ない (Fraleigh and Burnham, 1988)。また、滑走細菌の産生する藍藻溶解性物質を精製した例は皆無である。

本章の内容は、現場調査と室内実験とに分けられる。現場調査では、琵琶湖と諏訪湖をフィールドとして、第1節で、藍藻溶解性細菌の現存量を調査し、その季節変動と藍藻のブルームの消長との関連性について調べ、第2節で、両湖の表層水及び底泥表層から単離した藍藻溶解性細菌の分類学的性状並びに宿主特異性を調べた。また、得られた結果を、これまでに諏訪湖や他の湖沼で報告されている知見と比較検討した。室内実験では、まず第3節で、単離した藍藻溶解性滑走細菌の1株から、これまでに報告例のない藍藻溶解性物質の分離精製を試みた。第4節では、同細菌と藍藻との二者培養によって、これまでにほとんど明らかにされていない藍藻の溶解が引き起こされるための条件に特に注目しつつ、藍藻溶解の作用機作の検討を行った。最後に、本章で得られた結果をもとに、藍藻溶解性滑走細菌が藍藻ブルームの消滅現象に関与している可能性について論じた。

第1節 湖沼における藍藻溶解性細菌の現存量とその季節変動

緒言

藍藻溶解性細菌と藍藻ブルームとの関係を明らかにするためには、まず、現場の湖沼における藍藻溶解性細菌の現存量について知る必要がある。本節では、重層寒天平板

以上のように、沿岸海域における微細藻類溶解性・殺藻性細菌に関しては、近年精力的に研究が行われているが、これらの生理生態については、まだまだ不明な点も多い。特に有明海などで頻発している珪藻赤潮と珪藻溶解性細菌との関係については、まだほとんど知見が得られていない。

このような背景のもと、本研究においては、微細藻類溶解性細菌が藍藻のブルームや赤潮の消滅に果たして関与しているのかどうかという点に特に注目しつつ、湖沼及び沿岸海域におけるそれらの生理生態を明らかにすることを目的とした。

本論文は大きく2つに分けられる。すなわち、第2章においては、日本における代表的な富栄養湖である諏訪湖と、近年富栄養化の

進行が問題となっている琵琶湖南湖において、重層寒天平板法によって藍藻溶解性細菌の現存量を測定し、それらと藍藻のブルームとの関連性を明らかにしようとした。また、代表的な単離菌を用いて、その産生する溶解性物質の分離精製を試みると共に、単離菌と無菌培養の藍藻との二者培養によって、細菌による藍藻溶解の機作を詳細に検討した。第3章では、冬季に珪藻赤潮がしばしば発生しノリ養殖に被害を与えている有明海において、珪藻赤潮の出現期及びその前後に、従属栄養細菌相の変化や珪藻溶解性細菌の現存量の変動を調べることによって、珪藻赤潮の消長に関与する細菌群を明らかにしようとした。また単離した珪藻溶解性細菌の持つ溶解の作用機作についても検討した。

(Safferman and Morris, 1963 ; 山本, 1978) を用いたバイオアッセイ法によって、琵琶湖及び諏訪湖の表層水と底泥表層における藍藻溶解性細菌の現存量を調査し、その季節変動と藍藻ブルームの消長とを比較検討することによって、これらの細菌が藍藻ブルームの消滅に関与している可能性について探ろうとした。

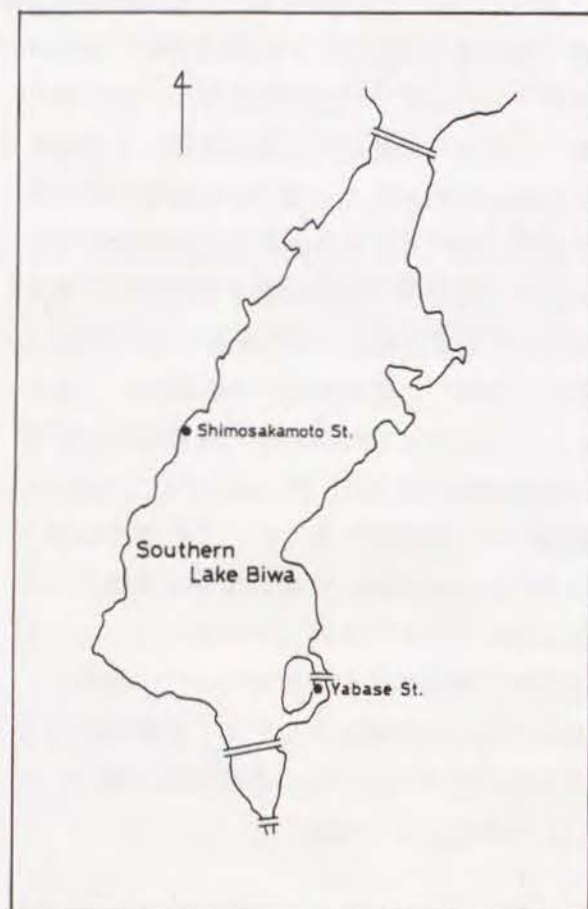


Fig. 2-1 Sampling sites in Southern Lake Biwa.

材料及び方法

調査定点の設定

琵琶湖においては、南湖東岸の矢橋付近及び西岸の下坂本付近に各1定点の計2定点を設定した (Fig. 2-1)。

諏訪湖においては、生物相互作用系の生態学的解析を目的として諏訪湖に設置された人工隔離水界 (メソコスム) の内と外に定点を設定した (Fig. 2-2)。メソコスムは諏訪湖内水深約4mの地点に固定したいかだに設置されていた。いかだの内側はチューブ状のポリエチレンシートを用いて4m×4mの6つの正方形の区画 (エンクロージャー) に分けられていた。エンクロージャーは、周囲の湖水から隔離されており、水深4mでチューブが閉じられているBag-typeと、チューブが底泥にまで達するTube-typeの2種類が用意されていた。

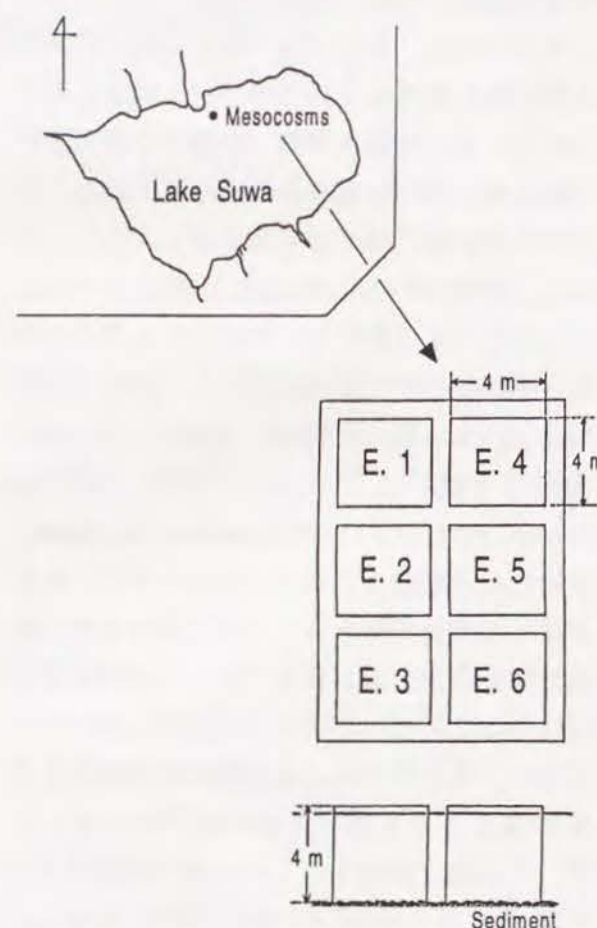


Fig. 2-2 Sampling sites in Lake Suwa.

採水及び採泥

琵琶湖においては、1985年の5月から10月の間、計9回のサンプリングを行った。諏訪湖においては、1985年及び86年の2ヶ年にわたって調査を行った。1985年には、9月11日、28日及び10月5日の計3回の調査を行った。定点は、エンクロージャー外の諏訪湖、エンクロージャーNo.1 (Bag-type) 及びエンクロージャーNo.5 (Tube-type) とした。エンクロージャーNo.1には、カワチブナが投入されていた。1986年には、5月から10月の間計6回の調査を行った。調査定点は、エンクロージャー外の諏訪湖、エンクロージャーNo.3及びNo.6 (いずれもTube-type) とした。

表層水はポリバケツを用いて採水し、藍藻溶解性微生物計数用試水は、あらかじめオートクレーブしておいたショットガラスビンに100ml採取し密閉した。また、微細藻類計数用試水は、100ml容のポリビンに採取し、その場でホルマリン溶液を5ml加えて固定を行った。クロロフィルa及びフェオ色素定量用試水は、1l容のポリビンに採取した。底泥はKK式柱状採泥器 (木俣ら, 1960) を用いて採取し、最表層を葉さじを用いてプラスチック容器に掻き取ったのち密閉した。すべてのサンプルはクーラー中で氷冷しながら実験室まで持ち帰り、以後の実験に供した。

微細藻類の現存量の測定

1985年の琵琶湖及び1986年の諏訪湖での調査においては、一定量の試水をWhatman GF/C フィルター (直径47mm) でろ過したのち、90% (v/v) のアセトンを用いてクロロフィルを抽出した。クロロフィルa量とフェオ色素量は、SCOR/UNESCO (1966) の方法により測定した。1985年の諏訪湖での調査におけるクロロフィルa量及び藍藻細胞数は、メソコスム実験ルー

チン観測結果 (林ら, 1985 ; 青山, 1985) を利用した。表層水中の微細藻類の種類の同定及びその細胞数の計数は、光学顕微鏡 (Nikon社, DIAPHOT-TMD) 下で検鏡することによって行った。

Table 2-1 Composition of CT medium.

Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	15	mg
KNO ₃	10	mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4	mg
Na ₂ -β-glycerophosphate	5	mg
Vitamin B ₁	1	μg
Vitamin B ₁₂	0.01	μg
Biotin	0.01	μg
TAPS*	40	mg
P IV metal mixture	0.3	ml
Distilled water	99.7	ml
pH	8.2	
P IV metal mixture		
FeCl ₃ ·6H ₂ O	19.6	mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	3.6	mg
ZnCl ₂ ·7H ₂ O	2.2	mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.4	mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	mg
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	100	mg
Distilled water	100	ml

*: N-Tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropanesulfonic acid

重層寒天平板法の宿主に用いた藍藻及びその前培養

調査当時、琵琶湖においては藍藻*Anabaena solitaria*が、諏訪湖においては藍藻*Microcystis aeruginosa*が、それぞれ毎年大増殖していた。しかしながら、これらについては無菌培養株が得られなかったため、1985年の琵琶湖及び諏訪湖での調査においては、宿主藍藻として東京大学応用微生物研究所 (IAM) の保存株である無菌培養の*Anabaena cylindrica* M-1(IAM) 株を用いた。1986年の諏訪湖での調査においては、現場でブルームを形成する種と同種の藍藻を宿主に用いた場合とブルーム形成種と

分類学的に目レベルで異なる藍藻を宿主に用いた場合（1985年調査）とで、得られる藍藻溶解性微生物の現存量に違いが見られるかどうかについて検討する目的で、国立環境研究所（NIES）の保存株である単藻培養の *M. aeruginosa* NIES-99株を宿主に用いた。これら宿主の前培養には、浮遊性藍藻用培地CT（Table 2-1）を使用し、25°C、20 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ （昼光色、24時間照射）の条件下で30日前後までインキュベートしたのち、平板上に生じた溶解斑（プラーク）を計数した。各プラークは1細胞の藍藻溶解性微生物によって形成されたものと考え、1ml当たりのプラーク数の平均値を plaque forming unit (pfu) として表わした。

重層寒天平板法による藍藻溶解性微生物の現存量の測定

藍藻溶解性微生物計数用試水は、研究室に持ち帰ったのち、直ちに滅菌蒸留水を用いて段階希釈した。底泥は、まず1gを秤量し、9mlの滅菌蒸留水に懸濁した。これをサーモミクサー（Vortex）で1分以上撹拌したのち静置し、

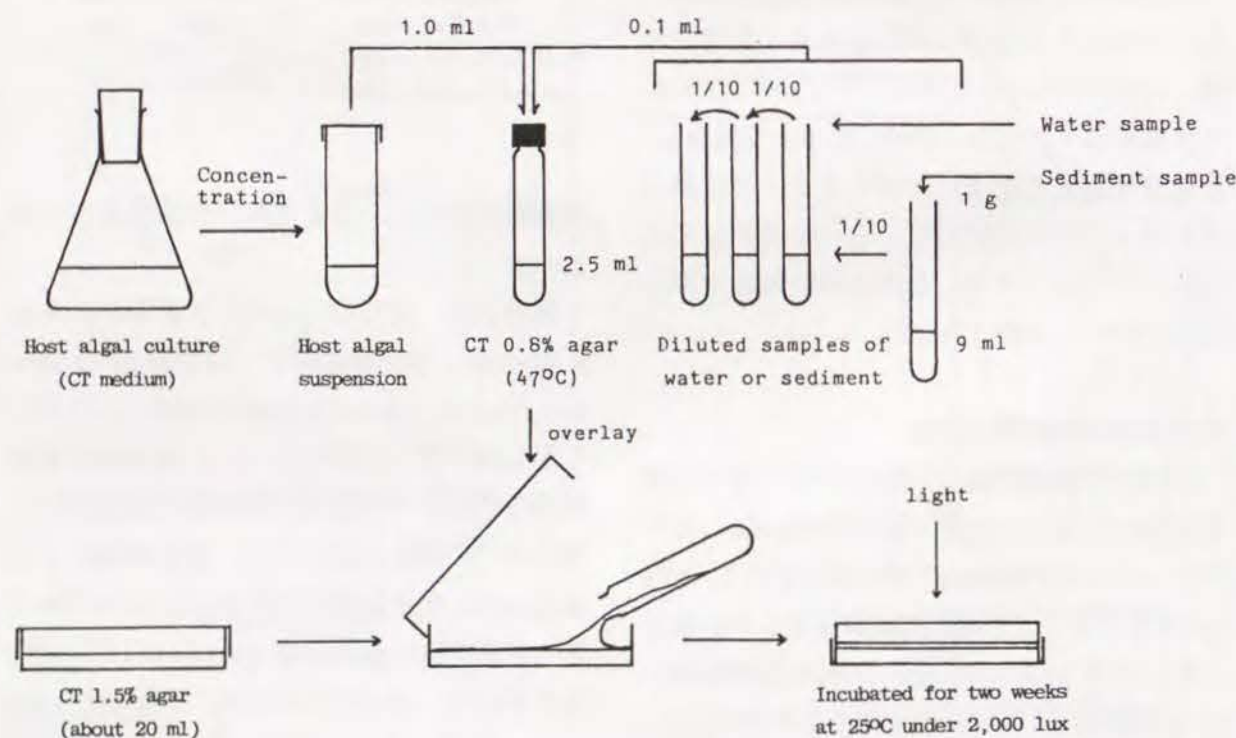


Fig. 2-3 Scheme of double-layered agar technique used for counting or searching algae lytic bacteria.

上澄みを取って1/10希釈サンプルと見なした。これをさらに滅菌蒸留水で段階希釈した。これらの試料について、重層寒天平板法（Safferman and Morris, 1963；山本, 1978）によって藍藻溶解性微生物の計数を行った。その概要をFig. 2-3に示す。重層寒天平板は各試料につき2枚ずつ作成し、25°C、20 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ （昼光色、24時間照射）の条件下で30日前後までインキュベートしたのち、平板上に生じた溶解斑（プラーク）を計数した。各プラークは1細胞の藍藻溶解性微生物によって形成されたものと考え、1ml当たりのプラーク数の平均値を plaque forming unit (pfu) として表わした。

藍藻溶解性微生物の種類の判定

重層寒天平板上に生じたプラークを無作為に選び、プラーク部分の軟寒天を白金耳ではぎとり、ノマルスキー型微分干渉顕微鏡（Nikon社、OPTIPHOT XF-NT）下で検鏡した。寒天中に存在する微生物の形態の特徴によって、細菌、アメーバ及び糸状菌などの原因微生物の特定を行った。プラークの形状（小型）などからシアノファージの存在が疑われた場合には、プラーク部分の寒天を白金耳で剥離し、宿主藍藻の培養液に接種した。藍藻溶解後の培養液を集めてクロロホルムを数滴加え、シアノファージ以外の溶解性微生物を死滅させたのち、クロロホルムを蒸発させた。このクロロホルム処理後の培養液を添加した宿主藍

藻の重層寒天平板を作成し、シアノファージによるプラークの出現の有無を調べた。

結果

琵琶湖における藍藻溶解性微生物の季節変動

1985年に調査を行った2定点における微細藻類及び藍藻溶解性微生物の季節変動をFig. 2-4及び2-5に示す。矢橋定点においては、クロロフィルa量及び藍藻 *A. solitaria* の細胞数は、8月下旬から9月にかけて急激に増加し、9月5日にはブルーム状態（アオコ状態）となり、クロロフィルa量は61.4 $\mu\text{g/l}$ に達した。*A. cylindrica*を宿主として調べた表層水中及び底泥表層中の溶解性微生物数はそれぞれ $10^2\sim$

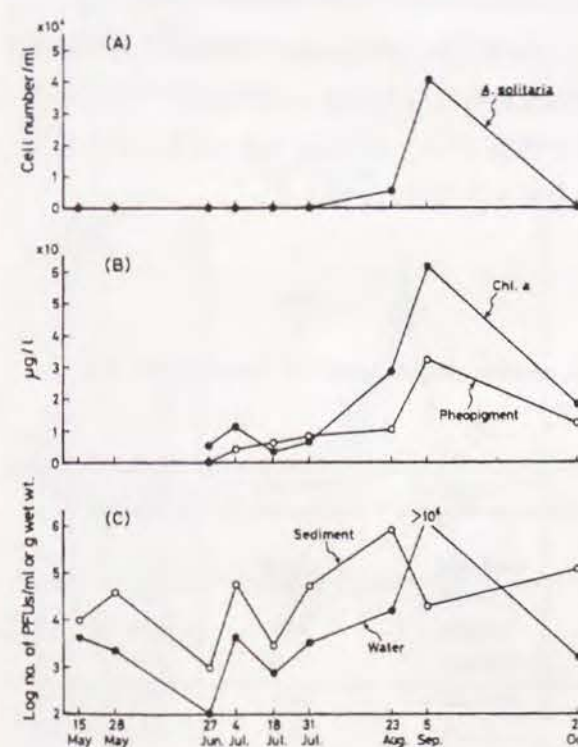


Fig. 2-4 Seasonal changes of the abundance of cyanobacteria and cyanobacteria lytic microbes at Yabase station in Southern Lake Biwa in 1985. (A) Cell number of *A. solitaria*, (B) Concentrations of chlorophyll-a and pheopigment, (C) Number of cyanobacteria lytic microbes

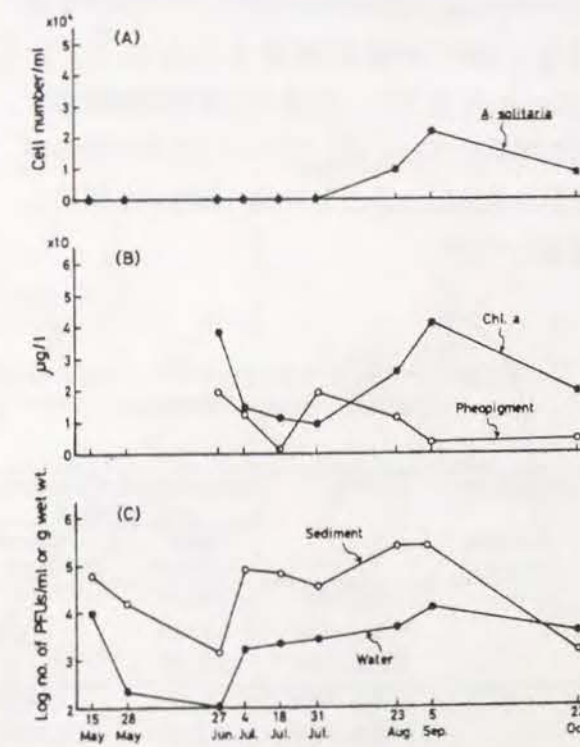


Fig. 2-5 Seasonal changes of the abundance of cyanobacteria and cyanobacteria lytic microbes at Shimosakamoto station in Southern Lake Biwa in 1985. (A) Cell number of *A. solitaria*, (B) Concentrations of chlorophyll-a and pheopigment, (C) Number of cyanobacteria lytic microbes

10^6 pfu/ml及び $10^3 \sim 10^6$ pfu/mlの範囲で変動した。表層水中の溶解性微生物数の変動パターンは*A. solitaria*の細胞数のそれとよく一致し、9月5日に最大値を示した。一方、底泥表層中の溶解性微生物数の変動パターンは、表層水中のクロロフィル量、フェオ色素量及び*A. solitaria*細胞数のいずれとも一致しなかった (Fig. 2-4)。下坂本定点においても、表層水中の*A. solitaria*細胞数と溶解性微生物数が共に9月5日にピークを示すという、矢橋定点と同様の結果が得られたが、両者の関連性は矢橋定点ほど顕著ではなく、それらの値は共に矢橋定点において得られた値よりも低かった (Fig. 2-5)。

琵琶湖における調査で見られた典型的なプラークをFig. 2-6に示す。生じたプラークを無作為に選び顕微鏡観察したところ、*A. cylindrica*を宿主として調べた藍藻溶解性微生物の種類については、アメーバと糸状菌の存在が少量確認されたものの、細菌が圧倒的に優占していた。

Table 2-2 Changes of the abundance of cyanobacteria lytic microbes, the abundance of cyanobacteria and some environmental factors in Lake Suwa in 1985.

Sampling sites (Enclosure number)	Date	Number of plaque forming unit*1 (PFU)		Cell number of <i>Microcystis aeruginosa</i> *2 (cells/ml)	Concentration of chlorophyll a*2 (μ g/l)	Water temperature ($^{\circ}$ C)	pH
		Water (PFU/ml)	Sediment (PFU/g wet wt.)				
1	11 Sep. 1985	3.0×10^1		1.3×10^5	69.7	24.2	9.7
	28 Sep. 1985	1.6×10^2		7.1×10^4	45.5	17.8	9.8
	5 Oct. 1985	1.7×10^2		1.5×10^4	11.7	17.1	ND*3
5	11 Sep. 1985	1.1×10^2	1.7×10^3	3.4×10^4	66.4	24.2	9.3
	28 Sep. 1985	8.7×10^1	6.7×10^2	1.0×10^5	71.4	17.8	9.1
	5 Oct. 1985	1.1×10^2	5.7×10^1	7.8×10^4	59.7	17.1	ND*3
Lake Suwa	11 Sep. 1985	1.0×10^1	6.7×10^2	ND*3	ND*3	ND*3	9.5
	28 Sep. 1985	6.7×10^1	8.7×10^2	ND*3	ND*3	17.9	8.8
	5 Oct. 1985	6.7×10^1	1.0×10^1	ND*3	ND*3	17.1	ND*3

*1: *Anabaena cylindrica* M-1 (IAM) was used as a host

*2: from routine data (Hayashi, et al., 1985, in Japanese; Aoyama, 1985, in Japanese)

*3: not determined

諏訪湖における藍藻溶解性微生物の季節変動

1985年に調査を行った3定点における藍藻溶解性微生物数と環境要因の変動をTable 2-2に示す。調査開始時の9月11日には、夏季に大発生していた藍藻*M. aeruginosa*のブルームは衰退し始めていたが、表層水中のクロロフィルa量は $66.4 \sim 69.7 \mu\text{g/l}$ と、比較的高いレベルであった。その後クロロフィルa量は、エンクローチャーNo.1では水温の低下と共にさらに減少したが、エンクローチャーNo.5では、あまり変動しなかった。その間の微細藻類の組成については、*M. aeruginosa*が圧倒的に優占していた。3定点いずれにおいても、*A. cylindrica*を宿主として調べた表層水中の藍藻溶解性微生物数は $10^1 \sim 10^2$ pfu/ml程度であり変動せず、いずれのエンクローチャーにおいても、クロロフィルa量や*M. aeruginosa*の細胞数との間に関連性は見られなかった。底泥表層中の溶解性微生物数は $10^1 \sim 10^3$ pfu/g wet wt.で、10月にはやや減少する傾向を示した。

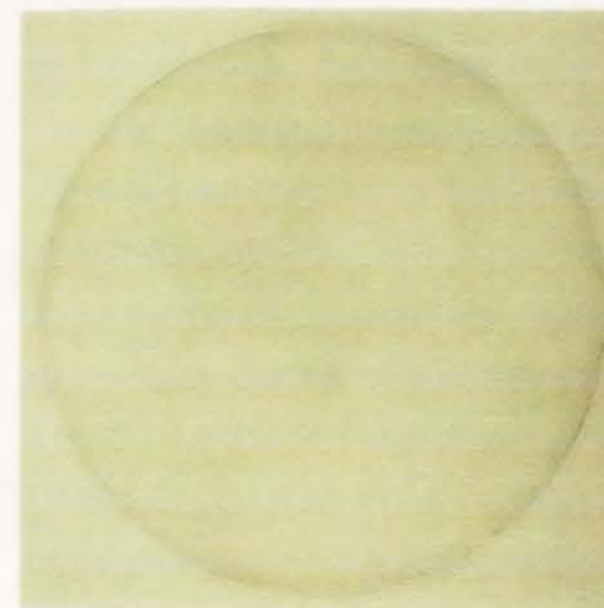


Fig. 2-6 Large plaques formed by cyanobacteria lytic gliding bacteria on a lawn of *Anabaena cylindrica* M-1 (IAM).

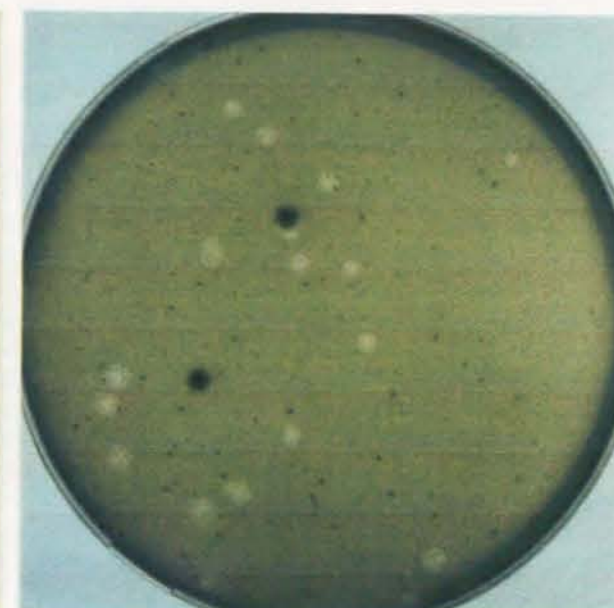


Fig. 2-8 Plaques formed by cyanobacteria lytic gliding bacteria on a lawn of *Microcystis aeruginosa* NIES-99.

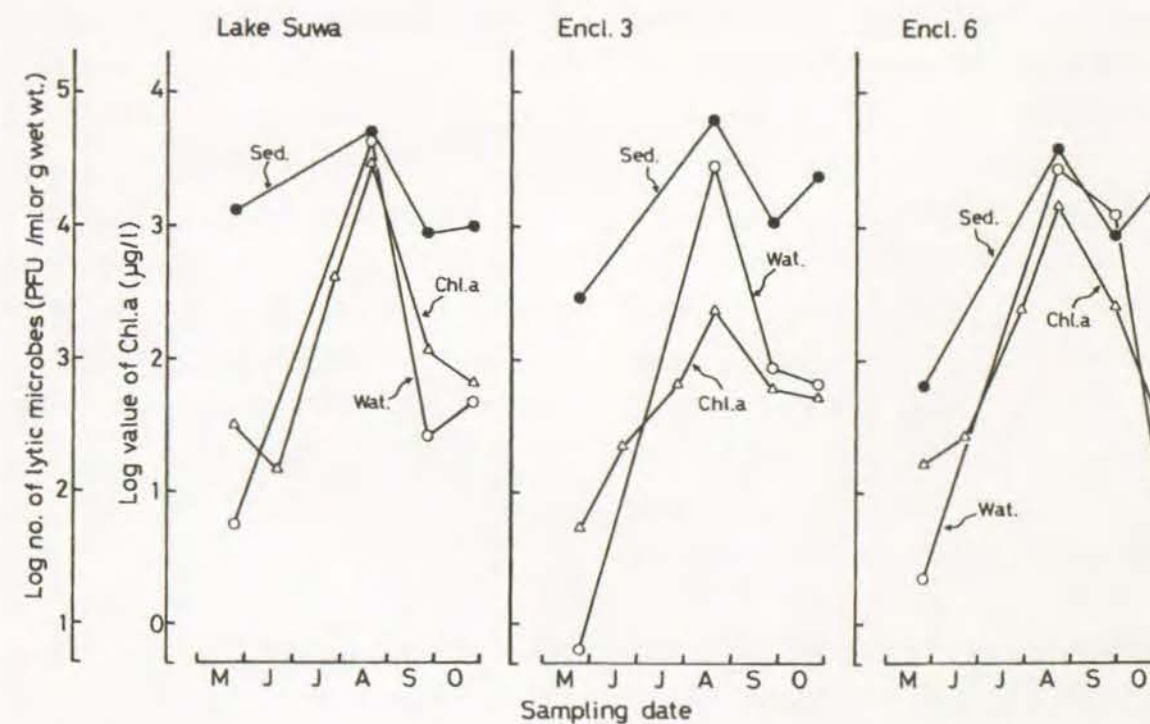


Fig. 2-7 Seasonal changes of the abundance of cyanobacteria lytic microbes in the surface water (○) and on the surface of sediment (●), and the abundance of chlorophyll-a (△) in the surface water in Mesocosms at Lake Suwa in 1986. *Microcystis aeruginosa* strain NIES-99 was used as a host alga.

重層寒天平板上に生じたプラークを無作為に選び顕微鏡観察したところ、*A. cylindrica*を宿主として調べた藍藻溶解性微生物の種類については、アメーバと糸状菌が1種ずつ確認されたものの、細菌が圧倒的に優占していた。

1986年に調査を行った3定点における藍藻溶解性微生物の現存量と環境要因の変動をFig. 2-7に示す。諏訪湖表層水中のクロロフィルa量は夏季に大きく増加して8月19日にピーク値(2900 $\mu\text{g/l}$)を示し、秋季には減少した。エンクロージャーNo.3及びNo.6においてもほぼ同様のクロロフィルa量の変動が見られた。微細藻類の組成については、いずれの定点においても、前年と同様に*M. aeruginosa*が優占種となっていた。*M. aeruginosa*を宿主として調べた表層水中の藍藻溶解性微生物数は、クロロフィルa量と同様に3定点いずれにおいても8月19日に、 10^4 pfu/ml付近の値でピークとなり、その季節変動はクロロフィル量のそれとよく一致していた。底泥表層中の溶解性微生物数は、やはり8月19日にピーク値を示したが、その変動は表層水中と比べると小さく、10月25日には再び増加する傾向を示した。

1986年の調査で見られた典型的なプラークをFig. 2-8に示す。生じたプラークを顕微鏡観察したところ、*M. aeruginosa*を宿主として調べた藍藻溶解性微生物の種類については、前年と同様に細菌が優占しており、シアノファージ、アメーバ及び糸状菌は検出されなかった。

考 察

本調査では、毎年夏季に藍藻のブルームが形成される琵琶湖南湖と諏訪湖において、藍藻溶解性微生物の現存量及びその季節変動を、2種の藍藻を宿主に用いて計数を行って調べた。その結果、琵琶湖においてはブルーム

を形成していた*A. solitaria*と同属の*A. cylindrica*を、諏訪湖においてはブルーム形成種と同種の*M. aeruginosa*を宿主に用いると、得られた藍藻溶解性微生物の現存量の季節変動と藍藻のブルームの消長が良く一致した(Figs. 2-4, 2-5と2-7)。

富栄養化した湖沼において、藍藻のブルーム発生時に藍藻溶解性微生物が増加する現象については、これまでに複数の報告がある。スコットランドの湖沼や貯水池において、藍藻*Anabaena flos-aquae*を宿主に用いて計数された藍藻溶解性細菌の現存量は、藍藻*Gleotrichia echinulata*, *Microcystis* sp., *Aphanizomenon* sp.及び*Anabaena circinalis*などのブルーム発生時にブルーム構成種の種類に無関係に増加し、その変動パターンはクロロフィルa量のそれと一致したと報告されている(Daft *et al.*, 1975; Stewart and Daft, 1976)。また、日本においても、霞ヶ浦で藍藻*Aphanothece nidulans*を宿主に用いて計数した藍藻溶解性微生物の現存量の季節変動は、クロロフィルa量のそれと一致したと報告されている(Yamamoto, 1981)。これに対して、諏訪湖において、*A. nidulans*や*A. cylindrica*を宿主に用いて計数した表層水や底泥中の藍藻溶解性微生物の現存量が、藍藻のブルームの最盛期よりもむしろブルームが消滅していく段階で増加してきたという調査結果も報告されている(山本, 1987, 1988; 山本ら, 1991; Yamamoto *et al.*, 1993)が、本調査では、底泥表層において藍藻のブルーム衰退後に溶解性微生物数がやや増加する傾向が見られた(Figs. 2-4と2-7)ものの、表層水ではそのような時間差は観察されなかった。このような時間差の有無を論じるためには、ブルーム最盛期から消滅期にかけて、本調査より短い間隔で調査を行う必要があるだろう。

藍藻のブルーム時における藍藻溶解微生物の現存量について、本調査では1985年9月5日に琵琶湖南湖の矢橋定点の表層水において、例外的に 10^6 pfu/ml以上という高い値が得られた (Fig. 2-4)。この時には試水の希釈が不足し、最も希釈した試水においても多数出現したプラークのために *Anabaena* が全体的に溶解してしまいプラークの計数が不可能であった。そのため推定値となっており、必ずしも 10^6 pfu/mlという値は信頼できるとは言えないが、 10^4 pfu/ml以上存在していたことは確かである。滑走細菌やアメーバによって生じたプラークは培養時間と共に広がっていく性質がある。従って、1枚当たり出現したプラークが数十を越えるような場合にはこのように測定不能になってしまうので、希釈段階の作成には注意が必要である。それ以外の、琵琶湖の下坂本定点及び1986年の諏訪湖では、藍藻ブルームの最盛期に得られた表層水中の溶解性微生物数は 10^4 pfu/mlのオーダーであった (Figs. 2-5と2-7)。これまでに報告されている現存量は、本調査で得られたものよりもやや低い。スコットランドの湖沼や貯水池では、*A. flos-aquae* を宿主に用いて計数した藍藻溶解性細菌の現存量が、種々の藍藻のブルーム時に最大 $10^2 \sim 10^3$ pfu/mlと報告されている (Daft et al., 1975)。霞ヶ浦、諏訪湖や木崎湖では *A. nidulans* を宿主に用いて計数した藍藻溶解性微生物の現存量の最大値が表層水中で 10^3 pfu/ml、底泥では 10^4 pfu/mlのオーダーと報告されている (山本, 1981; 山本ら, 1988)。

本研究において、1985年に諏訪湖で *A. cylindrica* を宿主に用いて調査を行った場合には、表層水中の藍藻溶解性微生物の現存量は $10^2 \sim 10^3$ pfu/mlと、1986年にブルーム形成種と同種の *M. aeruginosa* を宿主に用いて行った調査時と比較して1~2オーダー低い値が得られ

た (Table 2-2)。山本ら (1988) も、*M. aeruginosa* のブルームが出現する諏訪湖において *A. cylindrica* 及び *A. nidulans* の2種の藍藻を宿主に用いて藍藻溶解性微生物の現存量を調べ、ブルーム形成種と同じ *Chroococcales* 目 *Microcystaceae* 科の *A. nidulans* を宿主に用いた場合に1オーダー程度高い値が得られたことを報告している。これらの結果から、宿主の選択が藍藻溶解性微生物の現存量の評価に大きな影響を与えることは明らかである。従って、その評価を行う際には、ブルーム形成種と同種の藍藻を宿主に用いることが望ましい。無菌培養株が得られないなどの理由によりそれが不可能な場合には、可能な限り近縁な種を宿主に用いる必要があるだろう。

また、重層寒天平板法では生じたプラークは溶解性微生物の単一の細胞から生じたものと見なすが、第4節に示すように、溶解性微生物が溶解されつつある宿主細胞の回りに多数付着して、水中でコロニーを作っている可能性があり、試料の分散処理を充分に行わないと溶解性微生物数を過小評価する恐れがある。本調査では試料をサーモミクサーで分散処理したが、山本 (1988) がミクサーよりもホモジナイザーで分散処理した方が常に高い値が得られると報告していることから、実際の現存量は本研究で得られた値よりもさらに大きい可能性も考えられる。

藍藻溶解性微生物としては、本調査では滑走細菌が圧倒的に優占していた。現場でブルームを形成している藍藻と同種もしくは同属の藍藻を宿主に用いて計数した藍藻溶解性微生物の現存量がクロロフィルa量やブルーム形成種の現存量と一致した変動パターンを示したことと、その溶解性微生物の優占種が滑走細菌であったことを考え合わせると、琵琶湖や諏訪湖に藍藻ブルームの消長に関連した生

態を持つ滑走細菌群が存在している可能性が示唆される。

一方、諏訪湖においては、1983年から84年にかけて行われた調査において、表層水中では、春季から夏季のクロロフィル量増加期にはアメーバが、秋季から冬季のクロロフィル量減少期には細菌が主要構成種であったと報告されている (山本, 1987)。また、諏訪湖の底泥堆積物中では、アメーバと細菌が優占しており、*Myxococcus* 属のような子実体を作る滑走細菌の占める割合が全溶解性微生物数の数%~10%であったと報告されている (山本, 1988)。このように、同じ諏訪湖においても調査年や定点の違いによって藍藻溶解性微生物の優占種がやや異なっていることは、藍藻と溶解性微生物との間のみならず、複数の溶解性微生物間にも競合関係が存在する可能性を示唆している。

第2節 単離した藍藻溶解性細菌の分類学的性状及び宿主特異性

緒言

これまで、藍藻溶解性滑走細菌の宿主特異性は低いと報告されてきた (Shilo, 1970; Daft and Stewart, 1971; 山本, 1988; Yamamoto and Suzuki, 1990)。しかしながら前節で、諏訪湖において藍藻 *M. aeruginosa* のブルーム発生時に2種の藍藻 *A. cylindrica* M-1 (IAM) 株と *M. aeruginosa* NIES-99株を宿主に用いて藍藻溶解性微生物の現存量を調査したところ、ブルーム形成種と同種の *M. aeruginosa* NIES-99株を宿主に用いた場合に2桁多い藍藻溶解性滑走細菌が検出されたことは、*M. aeruginosa* NIES-99株を溶解できるが *A. cylindrica* M-1

(IAM) 株を溶解できない滑走細菌が諏訪湖に分布している可能性を示唆している。そこで本節では、前節において2種の藍藻を宿主に用いて琵琶湖と諏訪湖から単離した全30株の藍藻溶解性滑走細菌について、各種藍藻、緑藻及び細菌に対する溶解性を調べた。

材料及び方法

藍藻溶解性細菌の単離及び分類学的性状の検討

1985年の琵琶湖調査並びに1985年及び86年の諏訪湖調査時に藍藻溶解性細菌を重層寒天平板上に生じたプラークから白金耳を用いて釣菌し、カシトン(Difco) 0.5%を含むCT寒天培地 (Table 2-1) もしくはVy/2寒天培地 (Baker's yeast, 500 mg; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg; agar, 1.5 g; distilled water, 100 ml; pH 7.2) の上に画線した。画線を繰り返すことによって細菌の単離を行ったのち、*A. cylindrica* に対する溶解性の確認を行い、溶解性の認められた株をVy/2寒天培地上で保存した。さらに、1984年にも琵琶湖において予備調査を行い、*A. cylindrica* を宿主に用いた重層寒天平板法によって藍藻溶解性細菌1株 (LB-1株) を単離した。単離した細菌の分類学的性状の検討は常法 (駒形, 1985) に従って行った。

宿主特異性の検討に用いた微生物

宿主に用いた13種16株の微細藻類のうち、*A. solitaria* (琵琶湖株) は京都大学農学部 (当時) の梅崎博士から、*Phormidium tenue* (琵琶湖株) は京都市水道局の根来氏から、*Chlamydomonas reinhardtii* 137-C(-)株は神戸大学理学部の松田博士からそれぞれご厚意により譲り受けた。その他については、IAM, American Type Culture Collection (ATCC), NIES及び発酵研究所 (IFO)

の保存株をそれぞれ入手した。これらのうち、*A. cylindrica* M-1(IAM)株、*Synechococcus* sp. ATCC27344株、*Chlorella pyrenoidosa* C-28(IAM)株及び*C. reinhardtii* 137-C(-)株は無菌培養株で、残りは単藻培養株である。4種4株の細菌 *Escherichia coli* IFO3366株、*Bacillus subtilis* ATCC6051株、*B. megaterium* ATCC19213株及び *Micrococcus lysodeikticus* ATCC4698株については、IFO及びATCCの保存株をそれぞれ入手した。

宿主の前培養

藍藻については、CT培地を用い、25℃、 $20\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (昼光色、24時間照射) の条件下で150rpmの巡回培養を行った。緑藻は、*C. pyrenoidosa*については、C培地 (CT培地の成分のうち、40mgのTAPSの代りに50mgのTrisを添加し、pHを7.5に調整する)、*C. reinhardtii*については、TAP培地 (NH_4Cl , 40mg; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10mg; $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5mg; K_2HPO_4 , 9.4mg; KH_2PO_4 , 6.3mg; Trace metal II, 1.0ml; glacial acetic acid, 0.1ml; Tris, 242mg; distilled water, 99.8ml) を用い、藍藻と同条件下で培養した。細菌については、nutrient broth (Difco) を用い、

30℃、220rpmの巡回培養を行った。

宿主特異性の検討

*A. solitaria*を除く各微細藻類及び細菌については、その各々を増殖させた重層寒天平板上に、単離菌の培養液25 μl をそれぞれしみこませたろ紙ディスクを置き、25℃、 $20\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (昼光色、24時間照射) の条件下で2週間培養した。溶解活性の有無については、ろ紙ディスクの周囲に透明なブランクが形成された場合に強い溶解活性ありと、微細藻類及び細菌が完全には溶解されず不透明なブランクが形成された場合に弱い溶解活性もしくは増殖阻害活性ありと、ブランクが全く認められなかった場合に溶解活性なしとそれぞれ判定した。2株の *A. solitaria*については、重層寒天平板上で増殖しないため、各単離菌の培養液を *A. solitaria* の培養液に接種し25℃、 $20\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (昼光色、24時間照射) の条件下で2週間二者培養した。溶解活性の有無については、2週間培養後の二者培養液を光学顕微鏡 (Nikon社、OPTIPHOT XF-NT) 下で観察し、藍藻細胞が完全に溶解されていた場合に強い溶解活性ありと、藍藻細胞の溶解は顕著でないが対照区と比べ藍藻の

細胞密度が低かった場合に弱い溶解活性もしくは増殖阻害活性ありと、藍藻の溶解が全く見られず藍藻の細胞密度が対照区と同程度であった場合に溶解活性なしとそれぞれ判定した。

結 果

単離した藍藻溶解性細菌の分類学的性状

1985年の琵琶湖での調査においては、8株の藍藻溶解性細菌を単離した。それらに1984年に単離したLB-1株を加えた計9株の細菌の由来をTable 2-3に示す。溶解性細菌は両定点の表層水及び底泥表層のいずれから単離された。これら9株の細菌について若干の分類学的性状を調べた結果をTable 2-4に示す。9株の細菌はいずれも黄色の菌体色素を有する長桿菌で、Vy/2寒天平板培地上で特徴的なスウォーミング (Fig. 2-9) を示すことから、滑走細菌と考えられた。中でも1984年に単離したLB-1株 (Fig. 2-10) については、グリセロール処理

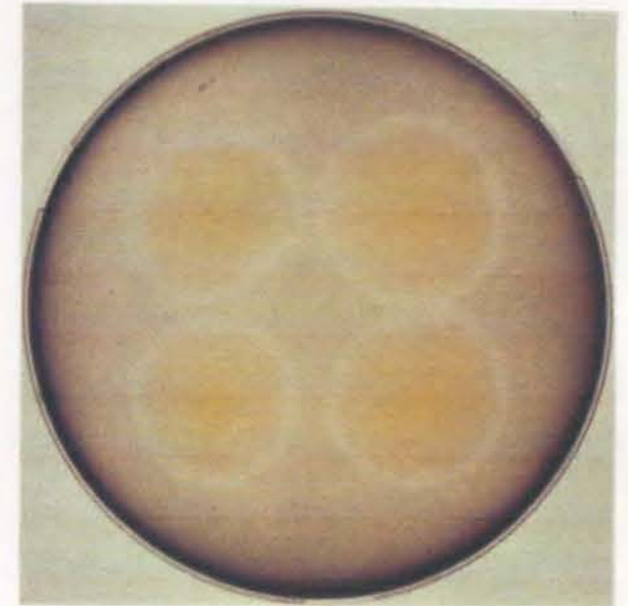


Fig. 2-9 Swarm colonies of *Lysobacter* sp. LB-1 on Vy/2 agar medium.

(Dworkin and Gibson, 1964) によってmyxosporeを形成しないこと、飢餓状態にしても子実体を形成しないこと及びHPLC法 (Tamaoka and Komagata, 1984) によるGC-含量が67%であっ

Table 2-3 Origin of cyanobacteria lytic bacteria isolated from Lake Biwa in 1984 and 1985.

Strain number	Sampling site	Sampling date	Source
LB-1	Shimosakamoto	May 30, 1984	Water
LB-2	Shimosakamoto	July 18, 1985	Water
LB-3	Yabase	July 31, 1985	Sediment
LB-4	Yabase	August 23, 1985	Water
LB-5	Shimosakamoto	October 22, 1985	Sediment
LB-6	Shimosakamoto	October 22, 1985	Sediment
LB-7	Shimosakamoto	October 22, 1985	Water
LB-8	Yabase	October 22, 1985	Water
LB-9	Shimosakamoto	October 22, 1985	Water

Table 2-4 Some taxonomical characteristics of cyanobacteria lytic bacteria isolated from Lake Biwa in 1984 and 1985.

	LB-1	LB-2	LB-3	LB-4	LB-5	LB-6	LB-7	LB-8	LB-9
Gram-stain	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility	Gliding	Gliding	Gliding	Gliding	Gliding	Gliding	Gliding	Gliding	Gliding
Shape	Long rod	Long rod	Long rod	Long rod	Long rod	Long rod	Long rod	Long rod	Long rod
Size (μm)	0.6-0.8	0.4-0.6	0.4-0.6	0.4-0.6	0.4-0.6	0.6-0.8	0.4-0.8	0.6-0.8	0.4-0.6
	$\times 2.4-4.8$	$\times 8.0-48$	$\times 3.2-4.8$	$\times 2.4-3.2$	$\times 3.2-4.8$	$\times 4.0-4.8$	$\times 3.2-4.0$	$\times 3.2-6.4$	$\times 2.4-4.0$
Colony color	Yellow	Orange	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
OF-test									
Fermentative	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidative	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidase	-	-	+	-	+	±	+	+	+
Catalase	-	-	+	+	+	+	+	-	-

たことから、*Lysobacter* 属 (Christensen and Cook, 1978) と同定された。

諏訪湖での調査においては、1985年には11株、1986年には10株の藍藻溶解性細菌をそれぞれ単離した。それらの細菌の由来をTable 2-5及び2-6に示す。1985年には9月11日及び10月5日の試料から単離を行ったが、溶解性細菌は、調査の対象とした3定点のいずれからも単離され、また底泥のないBag-typeのエンクロージャーNo.1を除いては表層水及び底泥表層のいずれからも単離された (Table 2-5)。1986年には、*M. aeruginosa*のブルームが最盛期であった8月19日の試料のみから単離を行ったが、前年と同様に溶解性細菌は3定点のいずれからも単離され、またエンクロージャーNo.3及びNo.6においては、表層水及び底泥表層のいずれからも単離された (Table 2-6)。1985年に単離した11株について若干の分類学的性状を調べた結果を、Table 2-7に示す。これらの細菌は、琵琶湖から単離した株と同様に、いずれも黄色の菌体色素を持つグラム陰性の長桿菌で、滑走運動を行うことから滑走細菌と考えられ

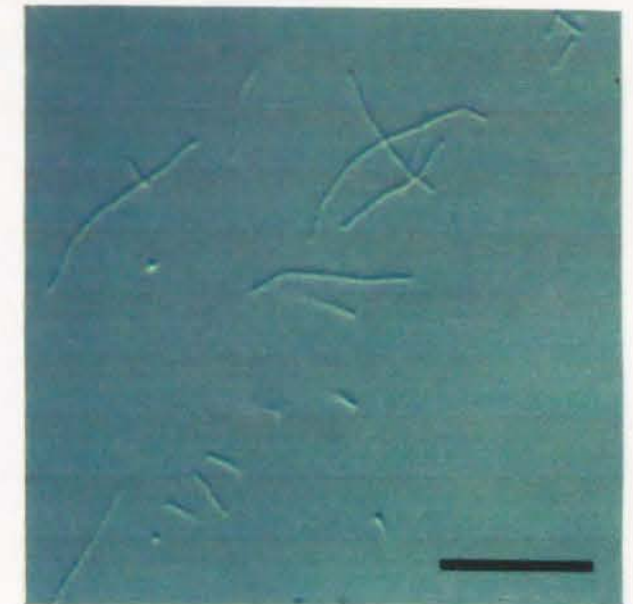


Fig. 2-10 Middle log phase cells of *Lysobacter* sp. LB-1 from CT liquid medium supplemented with 0.5% casitone (Difco). Bar=20 μ m

た。1986年に単離した10株については、いずれも固体表面での旋回運動及びVy/2寒天平板培地上でのスウォーミング等の特徴から滑走細菌と判断されたが、性状検査は行っていない。

Table 2-5 Origin of cyanobacteria lytic bacteria isolated from Lake Suwa in 1985.

Strain number	Sampling site	Sampling date	Source
LS-1	Lake Suwa	September 11	Sediment
LS-2	Enclosure No.5	September 11	Sediment
LS-3	Enclosure No.1	September 11	Water
LS-4	Enclosure No.1	September 11	Water
LS-5	Lake Suwa	September 11	Water
LS-6	Enclosure No.5	October 5	Sediment
LS-7	Enclosure No.5	October 5	Sediment
LS-8	Enclosure No.5	October 5	Sediment
LS-9	Enclosure No.5	October 5	Sediment
LS-10	Enclosure No.5	October 5	Water
LS-11	Enclosure No.5	October 5	Water

藍藻溶解性細菌の宿主特異性

1985年に*A. cylindrica* M-1(IAM)株を宿主として琵琶湖から単離した8株に、1984年に行った予備調査において琵琶湖から単離した*Lysobacter* sp. LB-1株を加えた計9株の細菌の宿主特異性をTable 2-8に示す。これらはいずれも、宿主を含むNostocales目の藍藻に対して強

い溶解活性を示す傾向が見られた。ただし9株中6株が*Anabaena variabilis* ATCC 29413株に対して、また9株全てが*Plectonema boryanum* M-101(IAM)株に対して溶解活性を示さなかった。一方、同年に琵琶湖ではブルームを形成しなかったが、諏訪湖においては毎年夏季に大増殖する*M. aeruginosa*を含むChroococcales

Table 2-6 Origin of cyanobacteria lytic bacteria isolated from Lake Suwa in 1986.

Strain number	Sampling site	Sampling date	Source
LS-12	Enclosure No.6	August 19	Water
LS-13	Enclosure No.6	August 19	Water
LS-14	Lake Suwa	August 19	Water
LS-15	Lake Suwa	August 19	Water
LS-16	Enclosure No.3	August 19	Water
LS-17	Enclosure No.3	August 19	Water
LS-18	Enclosure No.3	August 19	Sediment
LS-19	Enclosure No.3	August 19	Sediment
LS-20	Enclosure No.6	August 19	Sediment
LS-21	Enclosure No.6	August 19	Sediment

Table 2-7 Some taxonomical characteristics of cyanobacteria lytic bacteria isolated from Lake Suwa in 1985.

	LS-1	LS-2	LS-3	LS-4	LS-5	LS-6	LS-7	LS-8	LS-9	LS-10	LS-11
Gram-stain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility	Gliding	Gliding	Gliding	Gliding	Gliding	Gliding	Gliding	Gliding	Gliding	Gliding	Gliding
Shape	Long rod	Long rod	Long rod	Long rod	Long rod	Long rod	Long rod	Long rod	Long rod	Long rod	Long rod
Size (μm)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.2-0.4	0.4-0.6	0.6-0.8	0.4-0.6	0.6-0.8	0.6-0.8	0.4-0.6
	×4.0-5.6	×4.0-5.6	×3.2-4.8	×4.0-7.2	×3.2-4.8	×4.0-5.6	×3.2-4.0	×2.4-3.2	×2.4-3.2	×3.2-4.0	×3.2-4.0
Colony color	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
OF-test											
Fermentative	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidative	-	-	±	-	+	-	-	-	-	-	-
Oxidase	+	±	-	+	±	+	-	+	+	-	-
Catalase	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-

+, positive; ±, weakly positive; -, negative

目の藍藻に対しては溶解活性を示さなかったものが多く、9株中1株が*M. aeruginosa* NIES-99株に対して、3株が*Microcystis wesenbergii* NIES-105株に対してそれぞれ強い溶解活性を示したにすぎなかった。また緑藻や細菌に対しては、9株全てが溶解活性を示さなかったか、弱い溶解活性もしくは増殖阻害活性を示したに留まった。

1985年に*A. cylindrica* M-1(IAM)株を宿主として諏訪湖から単離した11株の細菌の宿主特異性を、Table 2-9に示す。これらは、琵琶湖から単離した株と同様に、宿主を含むNostocales目の藍藻に対して強い溶解活性を示す傾向が見られた。ただし11株中5株が*A. variabilis* ATCC 29413株に対して、8株が*P. boryanum* M-101(IAM)株に対してそれぞれ溶解活性を示

Table 2-8 Host specificities of cyanobacteria lytic gliding bacteria isolated from Lake Biwa by using *Anabaena cylindrica* M-1 (IAM) as a host in 1984 and 1985.

Host organism	Lytic bacteria								
	LB-1	LB-2	LB-3	LB-4	LB-5	LB-6	LB-7	LB-8	LB-9
Cyanobacteria									
Nostocales									
<i>Anabaena cylindrica</i> M-1(IAM)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. solitaria</i> (Lake Biwa)*	±	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>A. solitaria</i> NIES-80 (Lake Kasumigaura)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. affinis</i> NIES-72 (Lake Kasumigaura)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. variabilis</i> ATCC 29413	-	+	-	-	+	-	-	-	+
<i>Cylindrospermum licheniforme</i> ATCC 29412	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Plectonema boryanum</i> M-101 (IAM)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phormidium tenue</i> (Lake Biwa)	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Chroococcales									
<i>Synechococcus</i> sp. ATCC 27344	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-99 (Lake Suwa)	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>M. wesenbergii</i> NIES-105 (Lake Kasumigaura)	-	-	±	+	+	±	-	-	+
Green Algae									
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> C-28 (IAM)	-	-	-	-	-	±	-	±	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	-	-	-	-	-	-	±	-	-
Bacteria									
<i>Escherichia coli</i> IFO 3366	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. megaterium</i> ATCC 19213	-	±	-	-	-	-	-	±	-
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> ATCC 4698	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Results were read after 14 days of incubation. Lytic activity in each test noted as: +, good lysis; ±, weak lysis or growth inhibition; -, no lysis
*: These hosts were tested in liquid culture, others were on double layered agar culture.

さなかった。現場の諏訪湖においては*M. aeruginosa*が圧倒的に優占していたにも拘らず、*M. aeruginosa* NIES-99株に対して強い溶解活性を示したものは3株にすぎず、その他2種のChroococcales目の藍藻についても11株中10株が*Synechococcus* sp. ATCC27344株に対して、

5株が*Microcystis wesenbergii* NIES-105株に対してそれぞれ溶解活性を示さなかった。また緑藻や細菌に対しては、11株全てが溶解活性を示さなかったか、弱い溶解活性もしくは増殖阻害活性を示したに留まった。

Table 2-9 Host specificities of cyanobacteria lytic gliding bacteria isolated from Lake Suwa by using *Anabaena cylindrica* M-1 (IAM) as a host in 1985.

Host organism	Lytic bacteria										
	LS-1	LS-2	LS-3	LS-4	LS-5	LS-6	LS-7	LS-8	LS-9	LS-10	LS-11
Cyanobacteria											
Nostocales											
<i>Anabaena cylindrica</i> M-1(IAM)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. solitaria</i> (Lake Biwa)*	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+
<i>A. solitaria</i> NIES-80 (Lake Kasumigaura)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. affinis</i> NIES-72 (Lake Kasumigaura)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. variabilis</i> ATCC 29413	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+
<i>Cylindrospermum licheniforme</i> ATCC 29412	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>Plectonema boryanum</i> M-101 (IAM)	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>Phormidium tenue</i> (Lake Biwa)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chroococcales											
<i>Synechococcus</i> sp. ATCC 27344	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-99 (Lake Suwa)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>M. wesenbergii</i> NIES-105 (Lake Kasumigaura)	+	+	-	+	-	-	-	-	+	±	+
Green Algae											
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> C-28 (IAM)	-	±	-	-	-	±	-	±	-	±	±
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	-	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-
Bacteria											
<i>Escherichia coli</i> IFO 3366	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. megaterium</i> ATCC 19213	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> ATCC 4698	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Results were read after 14 days of incubation. Lytic activity in each test noted as: +, good lysis; ±, weak lysis or growth inhibition; -, no lysis.

*: These hosts were tested in liquid culture, others were on double layered agar culture.

1986年に*M. aeruginosa* NIES-99株を宿主として諏訪湖から単離した10株の細菌の宿主特異性をTable 2-10に示す。これらはいずれも、諏訪湖におけるブルーム形成種と同種の*M. aeruginosa* NIES-99株を含むChroococcales目の

藍藻に対して強い溶解活性を示す傾向が見られた。ただし*M. wesenbergii* NIES-105株に対しては、10株中4株が溶解活性を示さなかった。Nostocales目の藍藻については、溶解活性を示さなかったか、弱い溶解活性もしくは増殖阻

Table 2-10 Host specificities of cyanobacteria lytic gliding bacteria isolated from Lake Suwa by using *Microcystis aeruginosa* NIES-99 as a host in 1986.

Host organism	Lytic bacteria									
	LS-12	LS-13	LS-14	LS-15	LS-16	LS-17	LS-18	LS-19	LS-20	LS-21
Cyanobacteria										
Nostocales										
<i>Anabaena cylindrica</i> M-1 (IAM)	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
<i>A. affinis</i> NIES-72 (Lake Kasumigaura)	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±
<i>A. variabilis</i> ATCC 29413	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>Cylindrospermum licheniforme</i> ATCC 29412	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Plectonema boryanum</i> M-101 (IAM)	+	±	+	±	+	+	±	±	+	+
<i>Phormidium tenue</i> (Lake Biwa)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chroococcales										
<i>Synechococcus</i> sp. ATCC 27344	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-99 (Lake Suwa)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. aeruginosa</i> NIES-44 (Lake Kasumigaura)	-	+	+	±	+	+	+	+	+	+
<i>M. viridis</i> NIES-102 (Lake Kasumigaura)	-	+	+	±	+	+	±	+	+	+
<i>M. viridis</i> NIES-103 (Lake Kasumigaura)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. wesenbergii</i> NIES-108 (Lake Kasumigaura)	-	-	+	±	+	-	+	+	-	+
Green Algae										
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> C-28 (IAM)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacteria										
<i>Escherichia coli</i> IFO 3366	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. megaterium</i> ATCC 19213	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> ATCC 4698	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Results were read after 14 days of incubation. Lytic activity in each test noted as: +, good lysis; ±, weak lysis or growth inhibition; -, no lysis.

害活性を示したに留まったものが多く、*A. variabilis* ATCC 29413株に対して10株中5株が、*P. boryanum* M-101(IAM)株に対して10株中6株がそれぞれ強い溶解活性を示したにすぎなかった。緑藻及び細菌に対しては、10株全てが溶解活性を示さなかった。

考 察

本調査において、重層寒天平板上にブランクを形成した微生物はその殆どが細菌であり、それらの細菌の分類学的性状を調べたところ、単離した全ての株が滑走運動を示したことから滑走細菌と同定された。諏訪湖では、本調査と同じ1985年と86年に湖の中央部で行われた調査において、底泥試料から出現したブランクの主要原因生物は、*Myxococcus fulvus*を初めとする子実体を形成する*Myxococcus*属滑走細菌であったと報告されている(Yamamoto and Suzuki, 1990)。琵琶湖及び諏訪湖における主要な藍藻溶解性微生物は、滑走細菌であると考えられる。

従来、陸水域から単離された藍藻溶解性滑走細菌は宿主特異性が低いという報告が多くなされてきた。Nostocales目藍藻*P. boryanum*を宿主に用いてイスラエルの養魚池から単離された*Myxobacter (Lysobacter* sp.) FP-1株は、Nostocales目藍藻、Chroococcales目藍藻、緑藻及びグラム陰性細菌を溶解し、グラム陽性細菌を溶解しなかったと報告されている(Shilo, 1970)。Nostocales目藍藻*Nostoc ellipsosporum*, *Anabaena catenula*, *Phormidium foveolarum*及び*A. flos-aquae*をそれぞれ宿主に用いてスコットランドの湖沼から単離された*Myxobacter* (現在は*Lysobacter* sp.) CP-1~CP-4株は、Nostocales目藍藻、Chroococcales目藍藻及びグラム陽性・陰性細菌を溶解したと報告されている(Daft

and Stewart, 1971, 1973)。諏訪湖の底泥から単離された*Myxococcus fulvus* S-1-8株は、グラム陽性・陰性細菌や緑藻を溶解できなかったが、Nostocales目及びChroococcales目の藍藻については、試験に用いたいずれの株をも溶解したと報告されている(山本, 1988; Yamamoto and Suzuki, 1990)。本調査において単離された藍藻溶解性滑走細菌は、これらの報告とは異なり比較的高い特異性を示した。すなわち*M. aeruginosa*を宿主に用いて単離した溶解性細菌はChroococcales目の藍藻に対して、また*A. cylindrica*を宿主に用いて単離した溶解性細菌はNostocales目の藍藻に対して、各々限定された宿主特異性を示す傾向が見られた(Tables 2-8~2-10)。ただし、Nostocales目の藍藻の中でも、*A. variabilis*と*P. boryanum*については例外的な結果が得られた。すなわち、*M. aeruginosa*を宿主に用いて単離した細菌に溶解されるが、*A. cylindrica*を宿主に用いて単離した細菌に溶解されない場合が多かった。この2種の藍藻は、溶解性細菌によって産生される溶解酵素の基質となる細胞壁の構造が、調査に用いた他のNostocales目の藍藻とはやや異なり、むしろChroococcales目の藍藻のそれに近いのかもしれない。

以上の結果から、琵琶湖及び諏訪湖では、藍藻ブルームの出現時に、ブルーム形成種に特異的な溶解活性を持つ滑走細菌が増加してくるものと考えられた。両湖には、毎年発生する藍藻ブルームに依存した生態を持つ滑走細菌群が存在している可能性が示唆される。

一方、農学の分野ではすでに実用化の段階に入っている微生物農薬を有害藻類のブルームの防除に利用できないかという考えが出てきている(今井, 1994; 石田, 1994)。微生物農薬を水圏中に投与する場合、ブルーム形成種への限定された溶解・殺藻効果が当然要

求される。シアノファージは細菌よりも特異性が高い (Daft *et al.*, 1970) ことが知られており、微生物農薬として有望であるが、ターゲットとなる藻類がファージに対する抵抗性を比較的容易に獲得してしまうことが問題となるだろう。Cannonら (1976) や Burnetら (1981) は、シアノファージと藍藻の二者を連続培養すると、藍藻がファージに対する抵抗性を早期に獲得することを示した。抵抗性は、藍藻細胞の膜構造に変化が起き、ファージの吸着を妨げることによって獲得されるものと考えられている (Padan *et al.*, 1967)。細菌については、その作用が第3節と第4節で示すように酵素による細胞壁の溶解によるとすれば、耐性菌の出現という問題は比較的起こりにくいと思われる。本調査において得られたような比較的高い宿主特異性を持つ細菌は、微生物農薬としての利用が期待できるのではないだろうか。

第3節 *Lysobacter* sp. LB-1 株の産生する藍藻溶解酵素の分離精製

緒 言

藍藻溶解性滑走細菌が藍藻ブルームの消滅に関与しているかどうかを評価するためには、現場湖水中におけるそれらの現存量の情報以外にも、それらが持つ藍藻溶解活性の大きさについても知る必要がある。しかしながら、藍藻溶解活性の本体である藍藻溶解性物質については、細菌の培養液中にリゾチーム活性が見られるとの報告がなされている (Stewart and Brown, 1970; Daft *et al.*, 1985; Yamamoto and Suzuki, 1990) もの、いずれも物質は特定されておらず、分離精製された例

も見られない。本節においては、琵琶湖南湖から単離された Nostocales 目の藍藻に対して特異的な溶解活性を示す藍藻溶解性滑走細菌 *Lysobacter* sp. LB-1 株が細胞外に産生する藍藻溶解酵素の分離精製を試みた。

材料及び方法

藍藻溶解性細菌

藍藻溶解性細菌には、1984年5月30日に琵琶湖南湖下坂本の表層水中から *A. cylindrica* M-1 (IAM) 株を宿主に用いて単離された藍藻溶解性滑走細菌 *Lysobacter* sp. LB-1 株を用いた。

培地

Lysobacter sp. LB-1 株の培養には、0.5% カシトン (Difco) を添加した CT 培地を用いた。

藍藻溶解活性の測定

藍藻の細胞壁を取り巻く多糖類の鞘を除去し、藍藻細胞の溶解酵素に対する感受性を高める目的で、*A. cylindrica* M-1 (IAM) 株の藻体をドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液中で加熱処理した。CT 培地を用いて定常期まで培養したのち遠心分離 (8,000rpm×5min) によって集めた *A. cylindrica* の藻体を、4% SDS を含む 20mM トリス/塩酸緩衝液 (pH 8.5) に懸濁し、100℃で 30 分間加熱処理した。室温まで自然冷却したのち、SDS を除く目的で、藻体を大量の脱イオン水に懸濁し、遠心分離 (8,000rpm×5min) により沈殿させる操作を繰り返した。6 回の洗浄操作ののち、沈殿した SDS 加熱処理藻体を 20mM トリス/塩酸緩衝液 (pH 8.5) に再懸濁し、730nm における濁度が 1.0 となるように調整したものを基質溶液とした。基質溶液 1ml に対して試料を 0.05ml 加え、

30℃のウォーターバス中で 10 分間反応させた。10 分間に濁度を 0.001 減少させるような活性を 1 unit とした。

プロテアーゼ活性の測定

基質にアゾカゼイン (SIGMA 社) を用い、定法 (Charney and Tomarelli, 1947) により測定した。緩衝液には 20mM トリス/塩酸緩衝液 (pH 8.5) を用いた。アゾカゼインを同緩衝液に溶解し (25mg/ml)、基質溶液とした。その 0.5ml に対して酵素溶液 0.5ml を加え、40℃のウォーターバス中で反応させた。30 分後に、5%トリクロロ酢酸 4ml を加えて反応を止め、同時に未分解の基質を沈殿させた。遠心分離 (10,000rpm×10min) ののち上澄みを 0.5ml 取り、0.5N 水酸化ナトリウム溶液 0.5ml を加えた。基質が切断された結果溶液中に放出されたアゾ色素の赤色を、分光光度計により測定した。30 分間に 440nm における吸光度を 0.001 増加させるような活性を 1 unit とした。

LB-1 株の培養上清中に含まれる酵素活性

LB-1 株を、0.5% カシトン (Difco) を添加した CT 培地 500ml を入れた 2l 容の三角フラスコに接種し、毎分 100 往復の振とう培養器 (いわしや生物化学, RFR No.3) で 25℃, 36 時間培養した。その間 4 時間毎に、無菌的に培養液 2ml をとって遠心分離により上澄液をとり、上澄液中の藍藻溶解活性及びプロテアーゼ活性を測定した。

酵素の精製

(1) 細菌の培養

LB-1 株を、前々培養及び前培養ののち 5l の培地を入れた細胞培養用フラスコに接種し、無菌ろ過した空気を送り込みながらマグネチックスターラーにより攪拌 (250rpm) し、30℃

で 48 時間培養した。藍藻溶解性細菌の培養液を連続遠心分離 (13,000rpm) により集め、得られた培養ろ液を試料とした。この試料をもとに、以下の精製操作を行った。なお、精製操作はすべて 5℃で行った。

(2) 硫酸塩析

培養ろ液をマグネチックスターラーにより緩やかに攪拌しながら、あらかじめ乳鉢ですり潰した固形の硫酸アンモニウムを少量ずつ徐々に添加した。硫酸アンモニウムが 80% 飽和に達したのち、攪拌を止め、一晩放置した。翌日、連続遠心分離 (13,000rpm) により沈殿を集め、5% グリセロール及び 0.1M 塩化ナトリウムを含む 20mM トリス/塩酸緩衝液 (pH 8.0) に再溶解した。不溶性の物質を遠心分離 (8,000rpm×10min) によって除去したのち、100 倍量の同緩衝液に対して一晩透析し、粗酵素液とした。

(3) Q-Sepharose Fast Flow 陰イオン交換クロマトグラフィー

脱塩した粗酵素液について、Q-Sepharose Fast Flow (ファルマシア社) 陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。初期緩衝液には 5% グリセロール及び 0.1M 塩化ナトリウムを含む 20mM トリス/塩酸緩衝液 (pH 8.0) を用い、溶出は塩化ナトリウム濃度による段階溶出法により行った。ゲルベッド容積は 40ml (2.6×10cm)、流速は 1ml/min、分画サイズは 5ml とした。

(4) Mono S 陽イオン交換クロマトグラフィー (1 回目)

Q-Sepharose Fast Flow カラムクロマトグラフィーの結果、活性画分を集め、透析により緩衝液を交換したのち、Mono S HR5/5 カラム(フ

ファルマシア社) による陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。初期緩衝液には 5% グリセロールを含む 5mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0) を用いた。溶出は、0~0.2M 塩化ナトリウム直線濃度勾配法によって行った。流速は 0.5ml/min, 分画サイズは 1ml とした。

(5) Phenyl-Superose ハイドロフォービッククロマトグラフィー

Mono S カラムクロマトグラフィーの結果、活性画分を集め、透析により緩衝液を 20mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0) に交換した。更に、2M 硫酸アンモニウムを含む 20mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0) と混合し、硫酸アンモニウム濃度を 1.2M に調整した試料について、Phenyl-Superose HR5/5 カラム (ファルマシア社) によるハイドロフォービッククロマトグラフィーを行った。初期緩衝液には 1.2M 硫酸アンモニウムを含む 20mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0) を用いた。溶出は、硫酸アンモニウム濃度を 1.2~0M に下げると同時に、エチレングリコール濃度を 0~10% に上げるにより行った。流速は 0.5ml/min, 分画サイズは 1ml とした。

(6) Mono S 陽イオン交換クロマトグラフィー (2 回目)

Phenyl-Superose ハイドロフォービッククロマトグラフィーの結果、活性画分を集め、透析により、硫酸を除去したのち、Mono S HR5/5 カラム (ファルマシア社) による陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。初期緩衝液は 1 回目と同様のものを用いた。溶出は、0~0.1M 塩化ナトリウム直線濃度勾配法により行った。流速は 0.5ml/min (但し濃度勾配中は 0.1ml/min), 分画サイズは 0.5ml とした。

(7) Superose 6 ゲルろ過

Mono S カラムクロマトグラフィー (2 回目) の結果、活性画分を集め、透析により緩衝液を交換したのち、限外ろ過ユニット (ミリポア社, モルカット II) により濃縮した試料について、Superose 6 HR10/30 カラム (ファルマシア社) によるゲルろ過を行った。緩衝液には 20mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0) を用いた。流速は 0.5ml/min, 分画サイズは 0.5ml とした。

分子量マーカーとして、チトクローム C, ミオグロビン, キモトリプシノーゲン A, オボアルブミン, 及び牛血清アルブミンの 5 種類のタンパク質を用いた。これらの混合液について、同条件下でゲルろ過を行ない、それらの溶出時間を測定した。

(8) 電気泳動

Superose 6 ゲルろ過の結果、活性画分を集め、限外ろ過ユニット (ミリポア社, モルカット II) により約 10 倍に濃縮し、電気泳動用試料とした。0.0625M トリス/塩酸緩衝液 (pH 6.8) に対して透析を行ったのち、同試料 10 に対して 70% グリセロール及び 0.05% ブロモチモールブルーを含む 0.0625M トリス/塩酸緩衝液 (pH 6.8) を 1 の割合で混合し、アクリアミドゲルに添加した。市販のミニスラブゲル PAG プレート 4/15 (第一化学薬品社) を用い、試料添加量は 2, 5, 及び 10 μ l とした。泳動用緩衝液には 0.192M グリシン/0.025M トリス緩衝液 (pH 8.4) を用いた。泳動終了後、クーマシーブリリアントブルー G250 染色液により、室温で 1 時間タンパク質の染色を行ったのち、脱色液により適当なバックグラウンドが得られるまで脱色した。

至適温度及び至適 pH の検討

精製酵素標品の至適温度及び至適 pH について検討した。至適 pH の測定には、以下の緩衝液系を用いた。pH 4.0~6.0 については 20mM クエン酸緩衝液を、pH 6.0~7.5 については 10mM リン酸緩衝液を、pH 7.5~8.5 については 20mM トリス/塩酸緩衝液を、pH 8.5 及び 9.0 については 20mM 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール/塩酸緩衝液を、pH 9.0 及び 10.0 については 20mM グリシン/水酸化ナトリウム緩衝液を、pH 10.0~12.0 についてはリン酸二ナトリウム/水酸化ナトリウム緩衝液をそれぞれ用いた。プロテアーゼ活性は、前述の方法により測定した。

プロテアーゼ阻害剤の効果の検討

精製酵素標品の活性に及ぼすプロテアーゼ阻害剤の効果について検討した。阻害剤としては、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA), ふっ化フェニルメチルスルフォニル (PMSF), アンチパイン, ペプスタチン, ロイペプチン, 及びフォスフォラミドンを用いた。プロテアーゼ活性は前述の方法により測定した。

結 果

LB-1 株の培養上清中に蓄積する酵素活性

LB-1 株の増殖に伴い培養液中に放出される藍藻溶解活性及びプロテアーゼ活性を調べた結果を Fig. 2-11 に示す。藍藻溶解活性及びプロテアーゼ活性は、いずれも培養時間と共に上昇し、定常期に最大値を示した。また藍藻溶解活性とプロテアーゼ活性が、ほぼ同じパターンで増加した。この結果から、藍藻溶解活性の本体はプロテアーゼであると考え、酵素の精製においては、LB-1 株の定常期の培養液から、プロテアーゼ活性を追跡すること

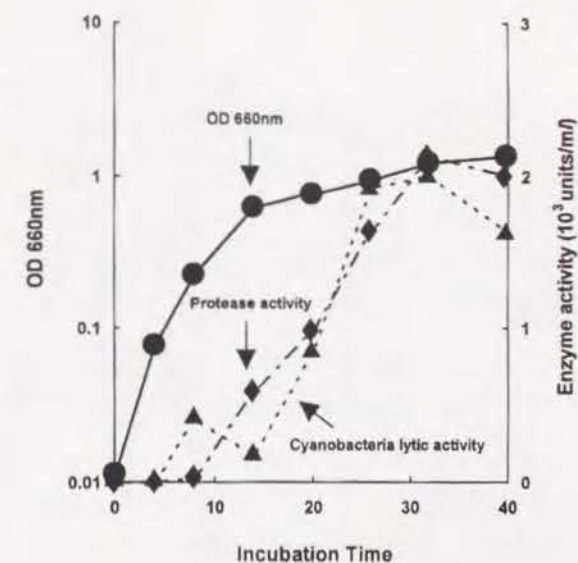


Fig. 2-11 Cyanobacteria lytic activity of extracellular enzyme excreted from *Lysobacter* sp. LB-1 during the incubation for 40 hours.

●, OD660nm; ▲, Cyanobacteria lytic activity; ◆, Protease activity

によって藍藻溶解性物質の精製を試みることにした。

酵素の精製

(1) Q-Sepharose Fast Flow 陰イオン交換クロマトグラフィー

硫酸塩析後の試料について Q-Sepharose Fast Flow 陰イオン交換クロマトグラフィーを行ったところ、プロテアーゼ活性は未吸着画分に認められた。同画分を集め、次のカラムクロマトグラフィーに用いた。

(2) Mono S 陽イオン交換クロマトグラフィー (1 回目)

Mono S 陽イオン交換クロマトグラフィー (1 回目) の結果を Fig. 2-12 に示す。プロテアーゼは Mono S カラムに吸着し、塩化ナトリウム濃度を上げることによって溶出した。プロテアーゼ活性は 4 本のピークに分かれて認められたが、塩化ナトリウム濃度 0.044M 及び

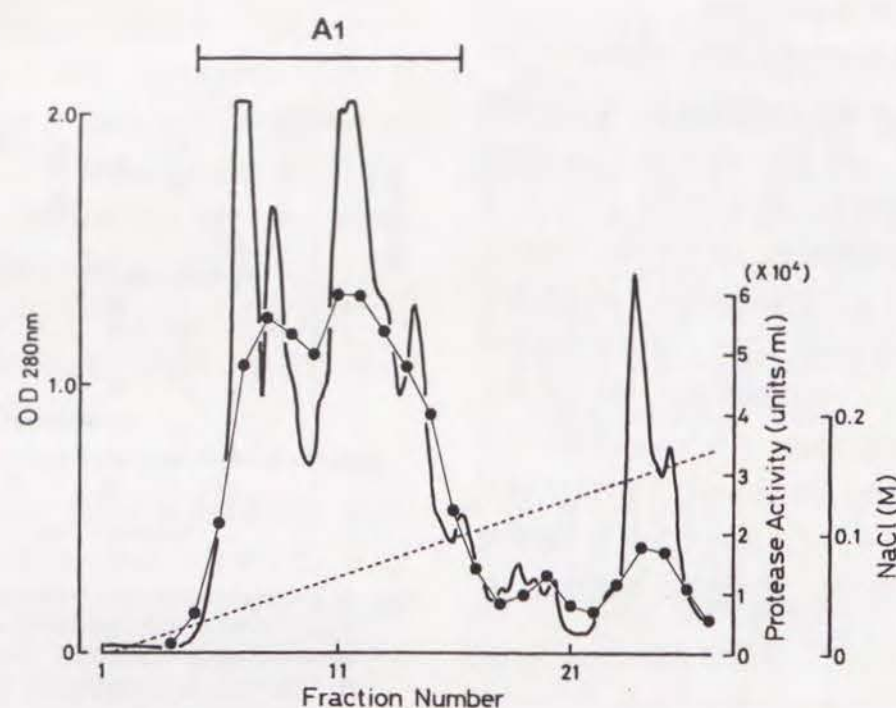


Fig. 2-12 Ion exchange chromatograph profile of active fraction from Q Sepharose FF on Mono S, eluted with linear gradient of 0-0.2M NaCl in 5mM citrate buffer containing 5% glycerol (pH 5.0).
—, Optical density at 280nm; ●—●, Protease activity; , Concentration of NaCl

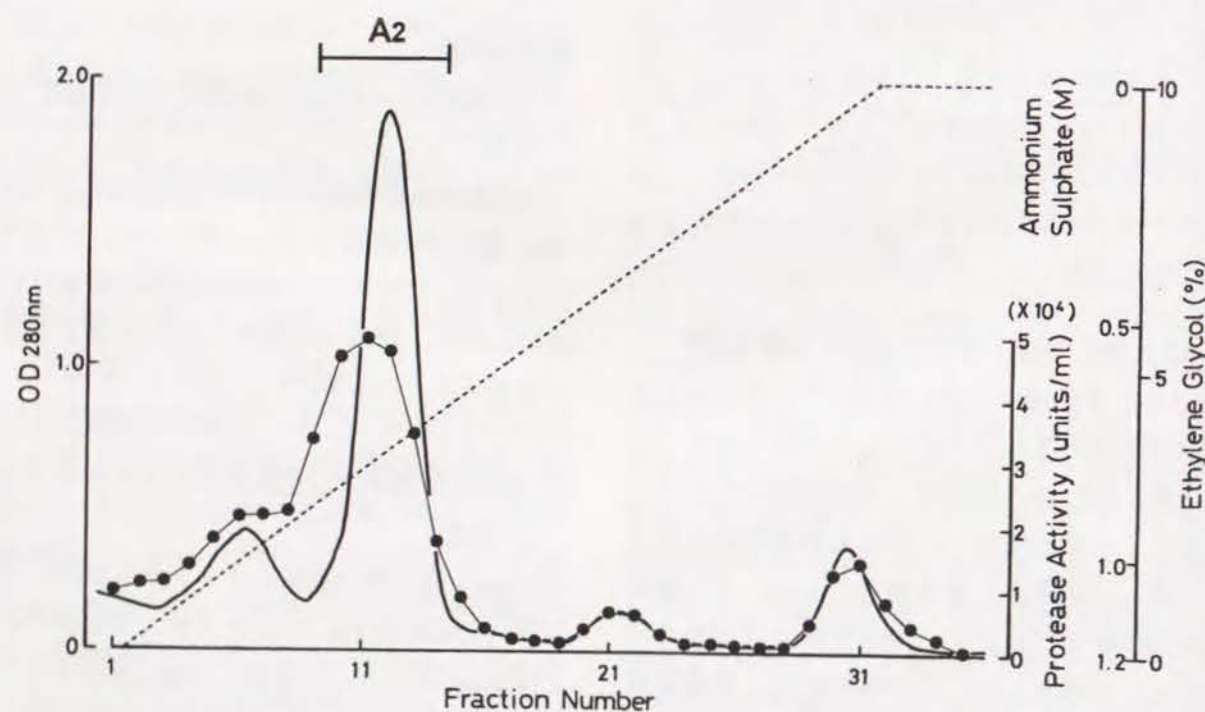


Fig. 2-13 Hydrophobic chromatograph profile of active fraction (A1) from Mono S on Phenyl-Superose, eluted with linear gradient of 1.2-0M ammonium sulfate (0-10% ethylene glycol) in 5mM citrate buffer (pH 5.0).
—, Optical density at 280nm; ●—●, Protease activity; , Concentration of ammonium sulfate (ethylene glycol)

0.068M の画分が最も高い活性を示した。塩化ナトリウム濃度 0.032M~0.108M の範囲の溶出画分 (A1) を集め、次のカラムクロマトグラフィーに用いた。

(3) Phenyl-Superose ハイドロフォービッククロマトグラフィー

Phenyl-Superose ハイドロフォービッククロマトグラフィーの結果を Fig. 2-13 に示す。プロテアーゼはカラムに吸着し、硫酸アンモニウム濃度を下げると同時にエチレングリコール濃度を上げることによって溶出した。プロテアーゼ活性は 4 本のピークに分かれて認められたが、硫酸アンモニウム濃度が 0.72M~0.82M の画分が、最も高い活性を示した。この画分 (A2) を集め、次のカラムクロマトグラ

フィーに用いた。

(4) Mono S 陽イオン交換クロマトグラフィー (2 回目)

Mono S 陽イオン交換クロマトグラフィー (2 回目) の結果を Fig. 2-14 に示す。プロテアーゼはカラムに吸着し、塩化ナトリウム濃度を上げることによって溶出した。プロテアーゼ活性は塩化ナトリウム濃度 0.03M 及び 0.064M を中心とした 2 本のピークに分かれた。より活性の高かった塩化ナトリウム濃度 0.024M~0.036M の範囲の画分 (A3) を集め、限外ろ過により濃縮したのち、次のゲルろ過を行った。

(5) Superose 6 ゲルろ過

Superose 6 カラムによるゲルろ過の結果を

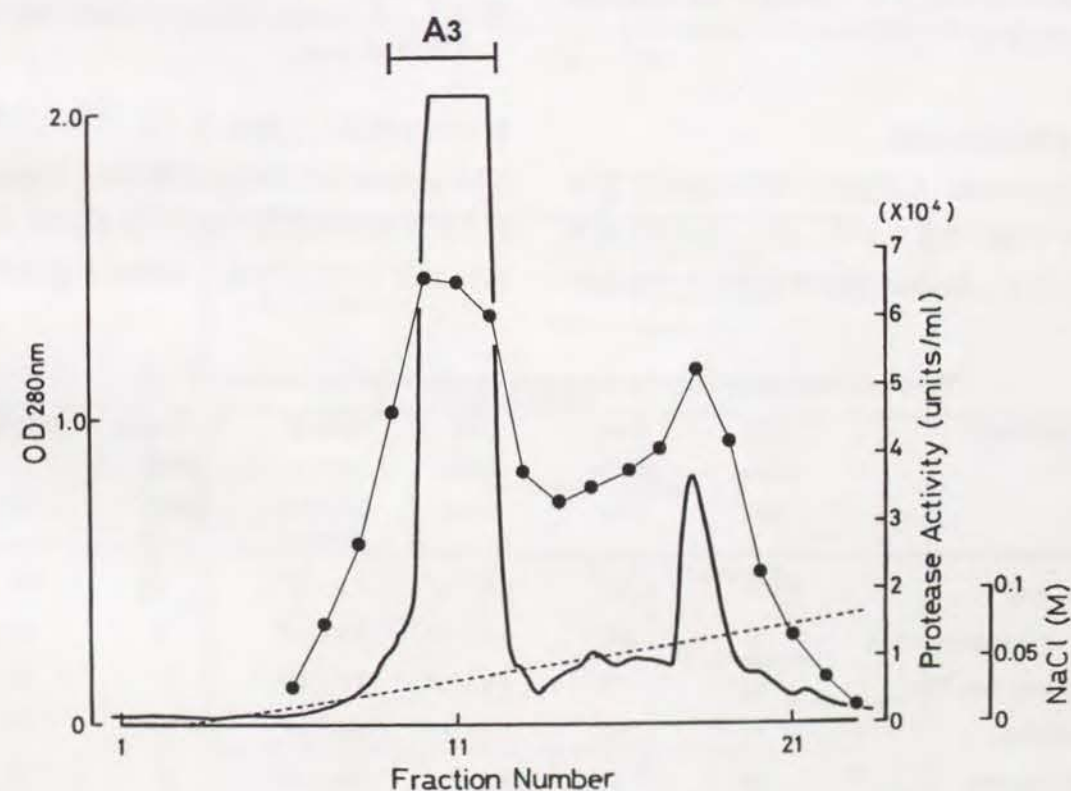


Fig. 2-14 Ion exchange chromatograph profile of active fraction (A2) from Phenyl-Superose on Mono S, eluted with linear gradient of 0-0.1M NaCl in 5mM citrate buffer containing 5% glycerol (pH 5.0).
—, Optical density at 280nm; ●—●, Protease activity; , Concentration of

Fig. 2-15 に示す。280nm における吸光度及びプロテアーゼ活性は、共に溶出液量 17.6ml の画分において、単一のピークとして認められたことから、精製が終了したものと判断した。精製の各段階における比活性の上昇と収率を Table 2-11 に示す。得られた精製プロテアーゼは、培養ろ液試料と比較して比活性が 36 倍に上昇し、また収率は 4.0%であった。同条件下で求めた分子量マーカータンパク質の溶出液量から、このプロテアーゼの分子量を求めたところ、約 32,000 であった (Fig. 2-16)。

(6) 電気泳動

同酵素の精製度を確かめるために、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った結果を Fig. 2-17 に示す。Rf 値 0.06 付近に単一のバンドが認められた。以下、同酵素を LB-1 protease A と仮称する。

藍藻溶解活性の検討

LB-1 protease A が藍藻の溶解に関与するかどうかを確かめるために、SDS 溶液中で煮沸処理した *A. cylindrica* 藻体を基質として藍藻溶

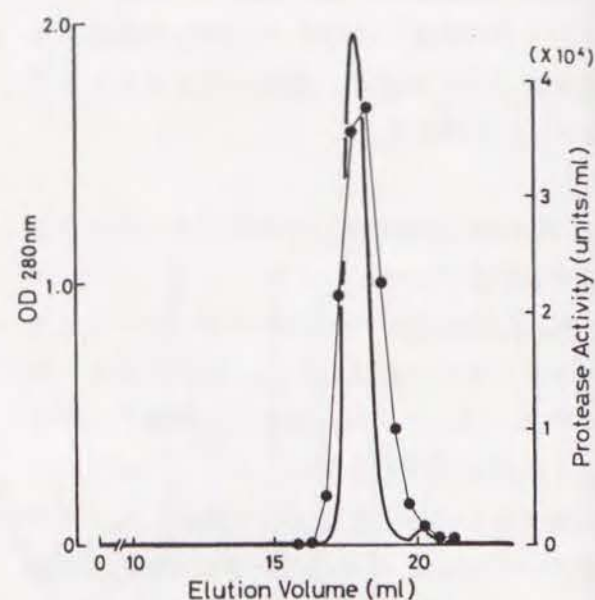


Fig. 2-15 Gel chromatograph profile of active fraction from Mono S (A3) on Superose 6, eluted with 20mM citrate buffer containing 5% glycerol and 0.2M NaCl (pH 5.0).
—, Optical density at 280nm; ●—●, Protease activity

解活性を測定した結果を Fig. 2-18 に示す。LB-1 protease A を添加した場合に、730nm における吸光度が無添加の場合よりも 120 分間に 0.35 減少したことから、同酵素が藍藻溶解活

Table 2-11 Purification chart of protease from the culture fluid of *Lysobacter* sp. LB-1.

Purification step	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg protein)	Purification factor (fold)	Recovery (%)
Culture fluid	5,000	4,500	6.0×10^6	1.3×10^3	1	100
Salting-out (ammonium sulfate)	74	260	5.0×10^6	2.0×10^4	15	84
Q Sepharose Fast Flow	65	75	3.1×10^6	4.1×10^4	32	52
Mono S (first)	48	59	2.1×10^6	3.6×10^4	28	35
Phenyl Superose	24	24	9.1×10^5	3.8×10^4	29	15
Mono S (second)	4	5.5	2.4×10^5	4.4×10^4	34	4.0
Superose 6	8	5.1	2.4×10^5	4.7×10^4	36	4.0

性を有することが確かめられた。

至適温度及び至適 pH

LB-1 protease A のカゼインに対する至適温度及び至適 pH について検討した結果を Fig. 2-19 に示す。同酵素の至適温度は 50~60°C の間に、至適 pH は pH10~11 の間にあった。

プロテアーゼ阻害剤の効果

LB-1 protease A に対するプロテアーゼ阻害剤の効果について検討した結果を Table 2-12 に示す。同酵素はセリンプロテアーゼ阻害剤である PMSF によって強く阻害され、アンチパインによってもやや阻害されたが、カルボキシルプロテアーゼ阻害剤であるペプスタチン、チオールプロテアーゼ阻害剤であるロイペプチン、メタルプロテアーゼ阻害剤である EDTA 及びフオスフォラミドンによっては阻害されなかったことから、セリンプロテアーゼであると推定された。

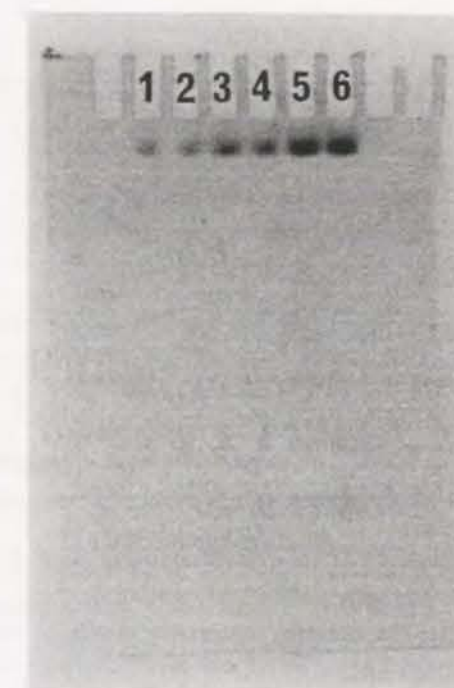


Fig. 2-17 Polyacrylamide gel electrophoresis of purified enzyme.
Lane 1 and 2, 2μl; Lane 3 and 4, 5μl; Lane 5 and 6, 10μl

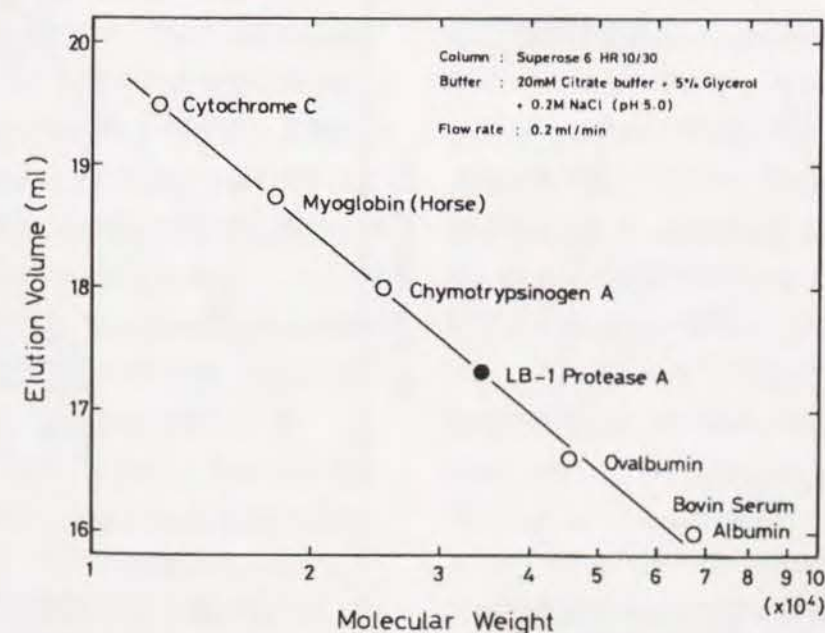


Fig. 2-16 Estimation of molecular weight of purified enzyme.

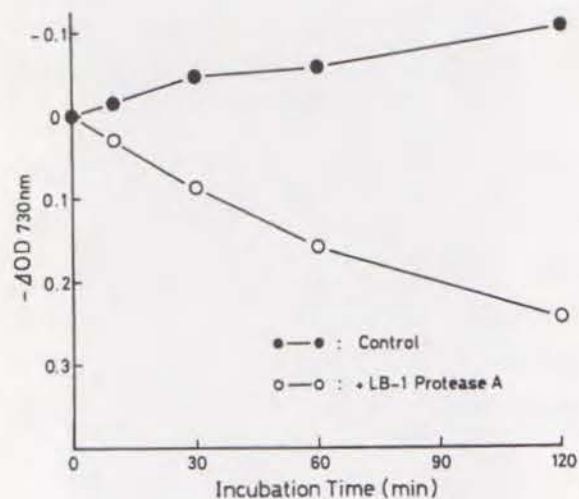


Fig. 2-18 Cyanobacteria lytic activity of purified enzyme against SDS boiled cell of *Anabaena cylindrica* M-1 (IAM).

藍藻溶解性滑走細菌の産生する藍藻溶解性物質については、一部の分離株についてリゾチーム活性を持つと報告されている (Stewart and Brown, 1970; Daft *et al.*, 1985, Yamamoto and Suzuki, 1990) が、それらを精製した例は全く見られない。本研究では初めて、藍藻溶解性細菌 *Lysobacter* sp. LB-1 株が培養液中に放出するプロテアーゼについて、硫酸塩析、Q-Sepharose Fast Flow 陰イオン交換クロマトグラフィー、Mono S 陽イオン交換クロマトグラフィー (1 回目)、Phenyl-Superose ハイドロフォービッククロマトグラフィー、Mono S 陽イオン交換クロマトグラフィー (2 回目) 及び Superose 6 ゲルろ過の順に精製操作を行ない、電気泳動的に単一のバンドを示すまで精製し

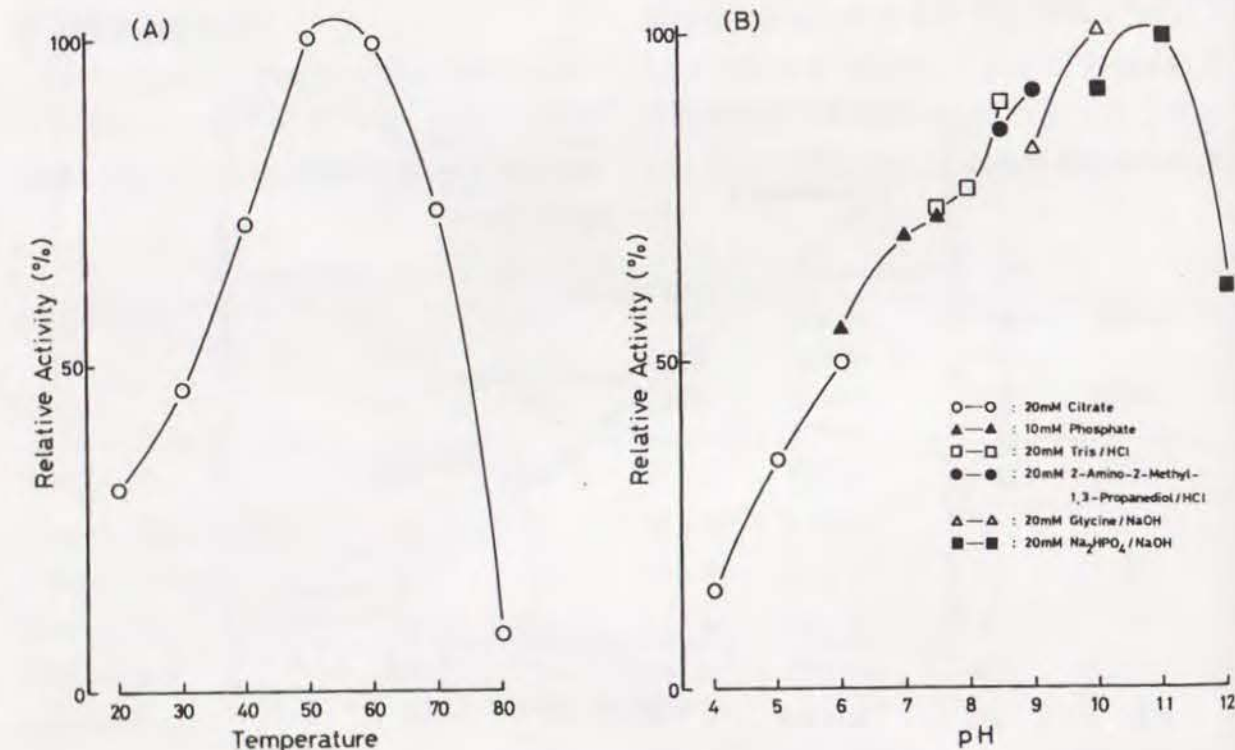


Fig. 2-19 Effects of temperature and pH. (A): Effect of temperature on the protease activity of purified enzyme. (B): Effect of pH on the protease activity of purified enzyme.

Table 2-12 Effect of inhibitors on the activity of purified enzyme.

Inhibitor	Concentration	Relative activity (%)
None		100
EDTA ^{*1}	5mM	94
PMSF ^{*2}	5mM	32
Antipain	2μg/ml	76
Pepstatin	2μg/ml	101
Leupeptin	2μg/ml	102
Phosphoramidon	2μg/ml	113

*1: Ethylenediaminetetraacetic acid

*2: Phenylmethylsulfonyl fluoride

た。精製されたプロテアーゼ (LB-1 protease A) は分子量が 32,000 ダルトンのセリンプロテアーゼで、至適 pH が 10~11 と極めてアルカリ側にあるという特徴を有していた。本酵素は SDS 溶液中で煮沸処理した藍藻の藻体を溶解する活性を示した (Fig. 2-18) ことから、LB-1 株の藍藻溶解能に関与する酵素であると考えられる。

精製された LB-1 Protease A は、至適 pH が 10~11 と極めてアルカリ側にあるという点で特徴的であった (Fig. 2-19(B))。藍藻溶解性細菌は一般にアルカリ性の環境で増殖しやすいという報告がなされている (Daft and Stewart, 1971)。LB-1 株が単離された琵琶湖南湖においても、藍藻がブルームを形成する夏期には pH が 8 以上、時には 10 付近まで達していたことから、この特徴は細菌の生活する環境と密接な関連を持つものと考えられる。

滑走細菌の中でも、myxobacteria の大多数はタンパク質を C 源及びエネルギー源として利用し、糖を利用できないとされている (Rosenberg and Varon, 1984)。従って、腐敗有機物を利用するにせよ、生きた他の細菌を餌にするにせよ、彼らの栄養摂取にはプロテアーゼが大きな役割をになっている。従って、myxobacteria の培養液中には、しばしばプロテアーゼ活性が見出されてきた (Noren, 1960;

Hüttermann, 1969; Harcke *et al.*, 1971)。これらについては、すでに分離精製が行われている例もある。Gnosspelius (1978) は、*Myxococcus virescens* の産生する少なくとも 3 種類のプロテアーゼのうちのひとつを精製し、それが分子量 26,000 ダルトンのセリンプロテアーゼで、カゼインとヘモグロビンを溶解する活性を持つほか、非極性の側鎖を持つアミノ酸を含むペプチド結合を特異的に切断する活性を持つことを示した。

Lysobacter 属細菌においても、溶菌活性をもつプロテアーゼが見出されている。*Sorangium* sp. (現在は *Lysobacter enzymogenes*) を 1% カザミノ酸、0.1% グルコース及び無機塩類を含む培地 (pH 7.1) で培養すると、カゼイン溶解活性を有するプロテアーゼが培養液中に蓄積する。これを Amberlite IR-45, IR-120 及び CG-50 クロマトグラフィーにかけた結果、 α -酵素と β -酵素の 2 種類の、いずれも分子量 19,000 ダルトンのセリンプロテアーゼが分離精製されている (Whitaker, 1965, 1967; Whitaker *et al.*, 1965)。また、*Myxobacter* AL-1 株 (現在は *Lysobacter enzymogenes*) を 1% 酵母エキスを含む培地 (pH 7.0) で培養すると、3 種類の溶菌酵素が培養液中に蓄積する。これらはいずれも分離精製されて基質特異性が調べられており、このうち Protease I は、塩化亜鉛

による沈殿, DEAE セルロース陰イオン交換クロマトグラフィー及び Sephadex G-100 ゲルろ過の操作によって精製された分子量 8,700 ダルトンのセリンプロテアーゼで、ペプチドグリカンのペプチド架橋の様々な部位を切断する活性を示した (Jackson and Wolfe, 1968)。これに対して Protease II は、単独では溶菌活性を持たないが、ペプチド鎖中のリジンのアミノ基側を特異的に切断する活性を示し (Wingard *et al.*, 1972), 3 つめの酵素は、 β -グルカナーゼとキトサナーゼ活性を示した (Hedges and Wolfe, 1974)。

LB-1 protease A は、AL-1 Protease I および *Sorangium* sp. α -, β -酵素と同じくセリンプロテアーゼであり、至適 pH はいずれもアルカリ側にあるという共通の特徴が認められた。一方、基質特異性に注目すると、LB-1 株はグラム陰性菌である *E. coli* を溶解できない点で上記の 2 株の *Lysobacter* 属細菌と共通していたが、両株が溶解できる *M. lysodeikticus* を溶解できない (Table 2-8), すなわちリゾチーム活性を持たない点で異なっていた。このことから、LB-1 protease A は、これらのプロテアーゼとは異なる作用機作を持つ可能性が高いと考えられる。比較的狭い LB-1 株の宿主特異性は溶解性酵素の基質特異性や作用機作に由来すると考えられることから、今後酵素の性状についてさらに検討する必要があると思われる。

第4節 二者培養による藍藻溶解の作用機作の解析

緒 言

藍藻溶解性細菌の持つ溶解の作用機作については、光学・電子顕微鏡下で藍藻溶解の過程を観察した報告は多い (Shilo, 1970; Daft and

Stewart, 1971; Daft *et al.*, 1973; Yamamoto and Suzuki, 1977; Burnham *et al.*, 1981, 1984) が、作用機作の詳細については未だ不明な点が多い。特にどのような条件下で藍藻の溶解が起こるのかについて検討した例は極めて少ない (Fraleigh and Burnham, 1988)。本節では、無菌培養の藍藻 *A. cylindrica* M-1 (IAM) 株と、前節で藍藻溶解活性を有するプロテアーゼを細胞外に産生することが明らかになった *Lysobacter* sp. LB-1 株とを二者培養し、藍藻の溶解を誘導する条件について詳細に検討した。

材料及び方法

藍藻溶解性細菌及び宿主

藍藻溶解性細菌には、*Lysobacter* sp. LB-1 株を用いた。宿主には、無菌培養の藍藻 *Anabaena cylindrica* M-1 (IAM) 株を用いた。

藍藻溶解性細菌の前培養

Lysobacter sp. LB-1 株の培養には、0.1% カシトン (Difco) を添加した CT 培地を用いた。

同培地 20ml を 300ml 容の三角フラスコに入れたものに、あらかじめ -80°C で冷凍保存しておいた対数増殖期後期の LB-1 株培養液を解凍したのち接種し、前々培養とした。対数増殖期後期まで培養したのち、50ml の同培地を 300ml 容の三角フラスコに入れたものに、660nm における濁度が 0.01 となるように植え継ぎ、前培養とした。いずれも、 25°C の恒温室内で旋回培養 (200rpm) した。

藍藻の前培養

Anabaena cylindrica M-1 (IAM) 株の前培養には、CT 培地を用いた。

50ml の CT 培地を 100ml 容の PP キャップ付き三角フラスコに入れたものに *A. cylindrica* を接種し、 25°C の恒温室内で $35\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (昼白色, 12D:12L) の光照射を行いながら旋回培養 (100rpm) した。

二者培養

前培養した対数増殖期の *A. cylindrica* を、50ml の CT 培地を 100ml 容の PP キャップ付き三角フラスコにいれたものに接種し、 25°C の恒温室内で、 $35\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (昼白色, 12L:12D) の光照射を行いながら旋回培養 (100rpm) 培養した。対数増殖期後期まで前培養した LB-1 株の培養液を滅菌したポリカーボネイト製遠沈管に入れ、 20°C , 8,000rpm \times 30min の条件で遠心分離して菌体を沈殿させた。菌体を滅菌した CT 培地に再懸濁し、遠心分離によって菌体を沈殿させる操作を 2 回くり返した。最後に菌体を適量の滅菌した CT 培地に懸濁して細胞密度を調整したのち、適当な培養期の *A. cylindrica* 培養液に接種した。これを、 25°C の恒温室内で $35\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (昼白色, 12L:12D) の光照射を行いながら旋回培養 (100rpm) 培養した。

藍藻溶解性細菌の計数

LB-1 株の細胞密度は、DAPI (4,6-Diamidino2-phenylindole Dihydrochloride) 染色法 (Porter and Feig, 1980) にしたがって、落射蛍光顕微鏡下で直接計数によって測定した。

藍藻の増殖量の測定

A. cylindrica の増殖量は、分光光度計 (島津製作所, UV-240) を用い 730nm における吸光度 (Simon, 1977) によって、もしくは蛍光光度計 (TURNER, FLUOROMETER Model 112) を用い蛍光値によって測定した。

接触の必要性の検討

直径 35mm のシャーレに、孔径 $0.4\mu\text{m}$ のタンパク低吸着性透明バイオポア CM メンブレンを底部に装着した直径 12mm のミリセル (MILLIPORE 社) を置き、ミリセルの内側には 0.3ml、ミリセルの外側のシャーレには 3.7ml の CT 培地を入れ、ミリセルの内側に *A. cylindrica* を、ミリセルの外側に LB-1 株をそれぞれ接種した。*A. cylindrica* 及び LB-1 株はシャーレ及びミリセルに入れた培地の合計量である 4ml に対し、それぞれ 1×10^5 及び 1×10^4 cells/ml の密度となるように接種した。シャーレを 25°C に保ったインキュベーター内に置き、 $35\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (昼白色) の光照射 (12D:12L) 下で培養した。予備実験によって、10 日間以上培養を続けると LB-1 株がメンブレンフィルターを通過してミリセル内に侵入することが示されたため、培養期間は最大 9 日間とした。

A. cylindrica 培養ろ液での LB-1 株の増殖

A. cylindrica を前培養と同条件下で培養し、培養 4, 8, 12 及び 16 日目の培養液をそれぞれ集めた。これを孔径 $0.2\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターを用いて無菌ろ過したろ液各 50ml に、LB-1 株を 1×10^4 cells/ml の密度となるように接種した。培養は二者培養と同条件下でこない、2 日毎に LB-1 株の細胞密度を調べた。

粗酵素液による藍藻細胞の溶解

LB-1 株をカシトン 0.5% を含む CT 培地で 36 時間培養し、そのろ液 800ml を遠心分離 (8,000rpm \times 30min) により集めた。この培養ろ液に、予め乳鉢ですり潰しておいた硫酸アンモニウムを、マグネチックスターラーによりゆるやかに攪拌しながら徐々に添加し、タンパク質を沈殿させた。硫酸アンモニウムが 80% 飽和に達した後、攪拌を止め一晩放置し

た。翌日、遠心分離 (8,000rpm×30min) により沈殿を集め、40ml/ 弱の 20mM トリス/塩酸緩衝液 (pH8.0) に再溶解した。これを 100 倍量の同緩衝液に対して一晚透析したのち 40ml/ にメスアップした。この 10ml/ を微量限外ろ過ユニット (ミリポア社, モルカットⅡ, 分画分子量 10,000 ダルトン) を用いて液量がほとんどなくなるまで濃縮したのち, CT 培地で 1ml/ にメスアップし, 粗酵素液とした。この粗酵素液 0.25ml/ を, 培養 6 日目及び 10 日目の藍藻培養液 0.25ml/ と混合したのち, スライドグラスにそれぞれ 1 滴のせ, カバーガラスをかけマニキュア液で完全に封入した。これを 25℃ の恒温室内に置き, 微分干渉顕微鏡 (Nicon 社, OPTIPHOT-2) で数時間毎に藍藻細胞の溶解の様子を観察した。

結 果

藍藻と藍藻溶解性細菌の二者培養

(1) 藍藻細胞の溶解過程の顕微鏡観察

LB-1 株を *A. cylindrica* の培養液に接種して二者培養を行うと, 細菌接種後しばらくの間は, 藍藻細胞の溶解は全く観察されなかった。細菌の細胞がその先端部で *Anabaena* の糸状体に付着している様子は散見されたものの, 細菌の密度が低いこともあり, その付着は顕著ではなかった。接種条件等によって日数は異なるが, 数日から 10 日の誘導期間を経たのち, 一部 (多くは先端部分) の細胞の色が薄くなり, サイズがやや小さくなった *Anabaena* の糸状体 (Fig. 2-20(a)) が観察されるようになった。このような糸状体を二者培養液ごとスライドグラス上に取り, 光学顕微鏡下で継続的に観

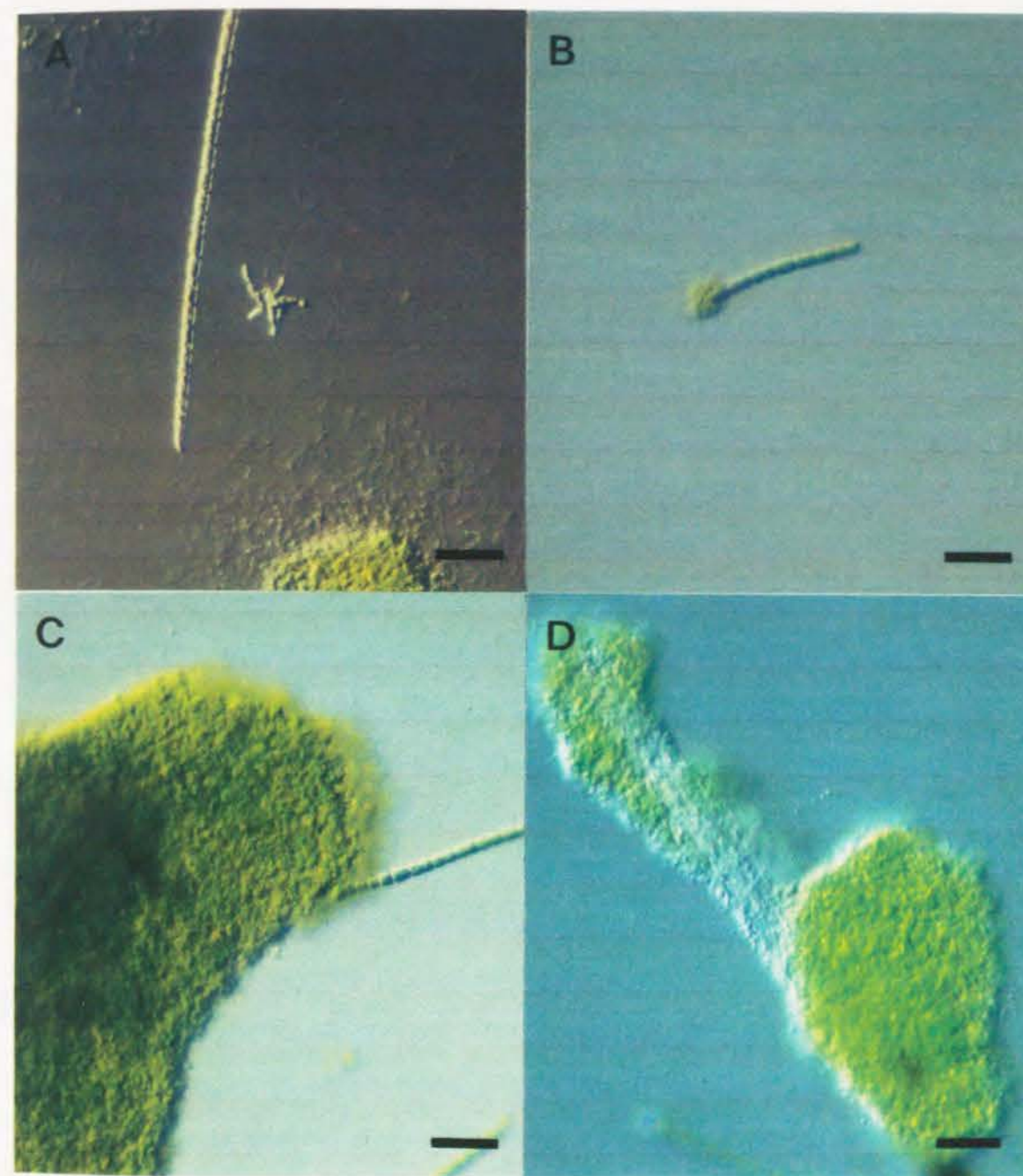


Fig. 2-21 Green clumps appeared in coculture. Bar=20μm.

- (A) A small clump consisted of several cells of *Anabaena cylindrica* M-1(IAM).
- (B) A small clump produced on a short trichome of *A. cylindrica*.
- (C) A large and irregular clump consisted of a large number of partially lysed cell of *A. cylindrica* and a entrapped and partially lysed trichome of *A. cylindrica* on the surface of the clump.
- (D) A clump contacting with another one by means of bundle like structure.

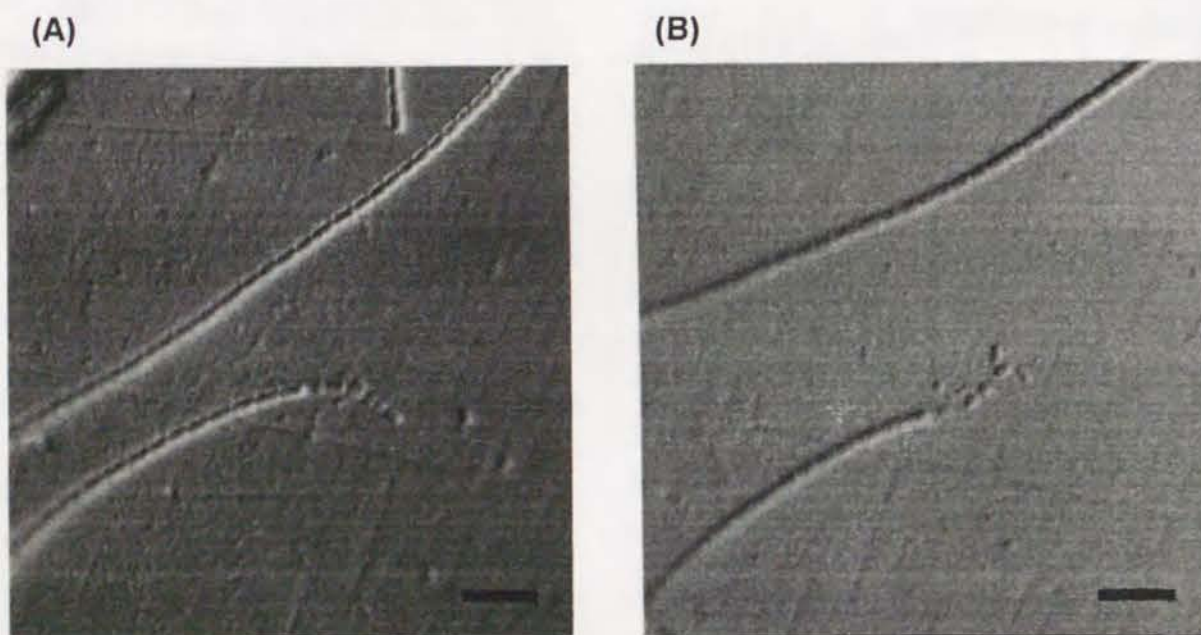


Fig. 2-20 Lysis of a trichome of *Anabaena cylindrica* M-1(IAM) by *Lysobacter* sp. LB-1. Bar=20μm.

- (A) A partially lysed trichome of *A. cylindrica* appeared in coculture.
- (B) Several cells of *A. cylindrica* were disjointed from the trichome within one hour of observation

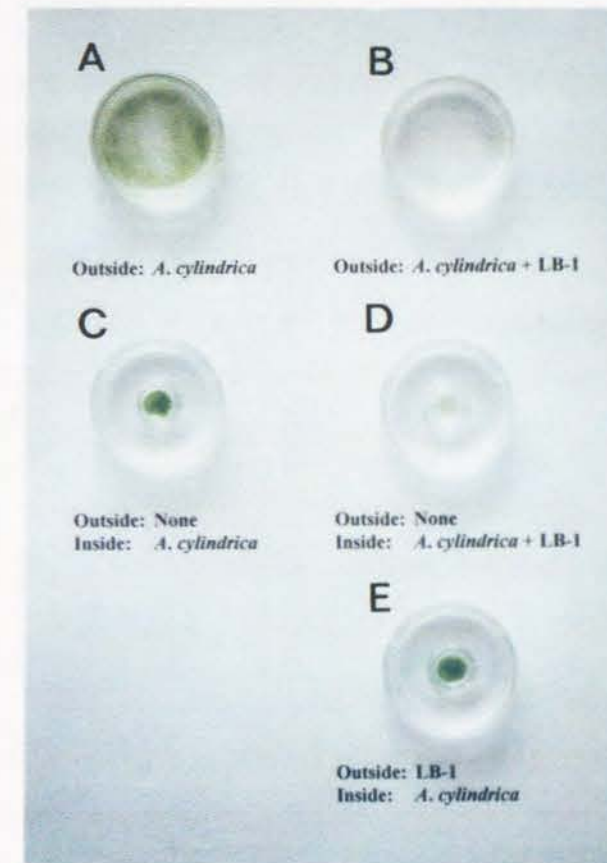


Fig. 2-22 Necessity of cell-to-cell contact for the lysis of *Anabaena cylindrica* M-1 (IAM) by *Lysobacter* sp. LB-1. Three pieces of MILLICELL (MILLIPORE Ltd., 12mm diameter) were set in three sterilized 35mm diameter petri dishes (C, D and E), respectively. Inside of MILLICELL was filled with 0.3ml of diluted culture (cell density was 1.3×10^6 cells/ml) of *A. cylindrica* M-1 (IAM). Outside of MILLICELL was filled with 3.7ml of CT medium. Other two petri dishes (A and B) were filled with 4.0ml of diluted culture (cell density was 1×10^5 cells/ml) of *A. cylindrica* M-1 (IAM). Zero point zero four ml of diluted culture (cell density was 1×10^6 cells/ml) of *Lysobacter* sp. LB-1 was added to *A. cylindrica* culture in petri dish B, in inside of MILLICELL of petri dish D, and added to CT medium in outside of MILLICELL of petri dish E, respectively. Two petri dishes (A and C) were not inoculated with LB-1 for control. Petri dishes were incubated at 25°C under the fluorescent lamp of $35 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (12L:12D) for 9 days. Although *A. cylindrica* was completely lysed in petri dishes B and D after 9 days of incubation, it was not lysed by LB-1 when separated from bacterium by membrane filter (petri dish E).

察したところ、LB-1 株がその細胞先端部で *Anabaena* の細胞に接触し、終始これをつつくようにして攻撃する様子が観察された。観察開始後 1 時間で、糸状体の先端部の細胞は切断されてばらばらになった (Fig. 2-20(B))。また、一部溶解・切断された糸状体が観察されると同時に、二者培養液中に緑色の塊 (Fig. 2-21) が出現してきた。これはばらばらに切断された藍藻細胞の固まりであり、その周囲には細菌が長軸方向を塊の中心に向けてびっしりと付着し、激しく運動していた。塊は、直径 $20\mu\text{m}$ 程度のもの (Fig. 2-21(A)と(B)) から、直径数数百 μm に達するもの (Fig. 2-21(C)) まで様々な大きさのものが観察されたが、塊の数及び大きさは培養時間の経過と共に増加した。塊が形成される過程については、2~3 細胞づつに切断されたいくつかの *Anabaena* の糸状体の断片が細菌によって接着されているような例 (Fig. 2-21(A)) や、糸状体の先端部分の細胞が溶解されて小さな塊が生じている例 (Fig. 2-21(B)) などが観察された。塊の大きさが増大する過程については、複数の塊が接触すると直ちに細菌によって 1 つの塊にまとめられる様子や、2 つの塊が細菌の束によって連結されているような例 (Fig. 2-21(D)) が観察された。また、塊の一部に *A. cylindrica* の糸状体が付着し、塊に取り込まれつつあるような例も観察された (Fig. 2-21(C))。さらに培養を続けると、塊内部の *Anabaena* 細胞はさらに溶解消化され、塊は次第に崩壊・消滅した。

(2) 接触の必要性の検討

顕微鏡観察により、溶解の過程において LB-1 株の菌体が *A. cylindrica* の細胞に付着している様子が観察された。そこで、菌体の藍藻細胞への接触が、藍藻の溶解を引き起こすための必要条件であるのかどうかを調べるために、細菌と藍藻を孔径 $0.4\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターで物理的に隔離し、物質の行き来は自由であるが細菌が藍藻に接触することができない条件を人為的に作り、藍藻の溶解が起こるかどうかについて検討した。その結果を、Fig. 2-22 に示す。

対照区として、ミリセルの内側及び外側にそれぞれ *A. cylindrica* のみを接種した区においては、藍藻は正常に増殖し、培養 9 日目に達しても藍藻細胞の溶解は観察されなかった。また同じく対照区として、ミリセルの内側及び外側の同一区画中に *A. cylindrica* と LB-1 株の両者を接種した区では、いずれにおいても培養 8 日目に藍藻細胞の溶解による培養液の退色が観察された。これらの区における細菌の細胞密度は、培養 9 日目にはそれぞれ 1.62×10^8 及び $2.23 \times 10^8 \text{ cells/ml}$ に達していた。一方、ミリセルの内側に *A. cylindrica* を、外側に LB-1 株をそれぞれ接種し、メンブレンフィルターによって細菌の藍藻への接触を妨げた区においては、培養 9 日目に至るまで、藍藻細胞の溶解は観察されなかった。ミリセルの外側の細菌の細胞密度は、培養 9 日目でも $1.60 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ に留まっていた。また、ミリセルの内側からは、細菌は検出されなかった。

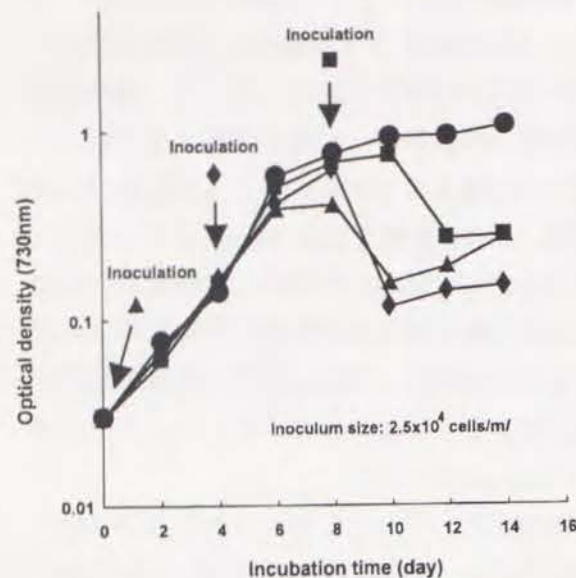


Fig. 2-23 Effect of the growth phase of *Anabaena cylindrica* M-1 (IAM) on the lysis by *Lysobacter* sp. LB-1. Each point indicates the average of the duplicate.

- , Growth curve of *A. cylindrica* (not inoculated)
- ▲, Growth curve of *A. cylindrica* (LB-1 is inoculated at lag phase.)
- ◆, Growth curve of *A. cylindrica* (LB-1 is inoculated at log phase)
- , Growth curve of *A. cylindrica* (LB-1 is inoculated at stationary phase)

(3) 二者培養液中における藍藻及び細菌の増殖

藍藻の生理状態が細菌による藍藻溶解に及ぼす影響を調べる目的で、*A. cylindrica* の培養開始直後、培養 4 日目（対数増殖期）及び 8 日目（対数増殖期後期）に LB-1 株を 2.5×10^4 cells/ml とするにそれぞれ接種し、二者培養を行った。藍藻の溶解は、細菌接種時の培養齢に拘らず、いずれの接種区においても藍藻が定常期に達した培養 10 日目以降に観察され、早い時期に LB-1 株を接種した区ほど、藍藻の溶解が始まるまでの誘導期間が長いという結果が得られた (Fig. 2-23)。

次に、藍藻の溶解に及ぼす LB-1 株の接種密度の影響を調べる目的で、*A. cylindrica* の培養 4 日目（対数増殖期）に LB-1 株を 2.5×10^4 cells/ml 及び 2.5×10^6 cells/ml の初期密度となるようにそれぞれ接種し、二者培養を行った。藍藻の溶解は、いずれの接種区においても藍藻が定常期に達した培養 11 日目以降に観察され、接種密度を高くしても藍藻溶解の時期が早まることはなかった (Fig. 2-24)。

そこで、二者培養液中で LB-1 株がどのように増殖しているのかを確認する目的で、*A. cylindrica* の培養開始直後に LB-1 株を初期密度が 1×10^4 及び 1×10^6 cells/ml とするにそれぞれ接種し、細菌の増殖過程を観察した。その結果を、Fig. 2-25 に示す。

1×10^4 cells/ml 接種区では、培養 10 日目に蛍光値が低下すると共に培養液の色が黄緑色を帯びているのが観察され、藍藻細胞の溶解が

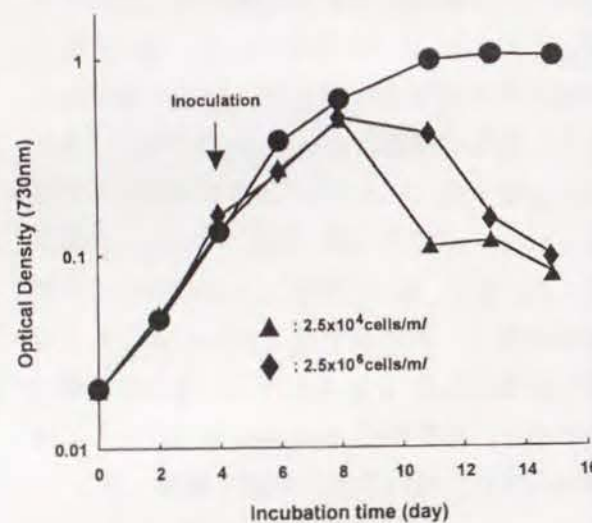


Fig. 2-24 Effect of the inoculum size of *Lysobacter* sp. LB-1 on the lysis of *Anabaena cylindrica* M-1 (IAM). Each point indicates the average of the duplicate.

- , Growth curve of *A. cylindrica* (not inoculated)
- ▲, Growth curve of *A. cylindrica* (Inoculum size of LB-1 is 2.5×10^4 cells/ml)
- ◆, Growth curve of *A. cylindrica* (Inoculum size of LB-1 is 2.5×10^6 cells/ml)

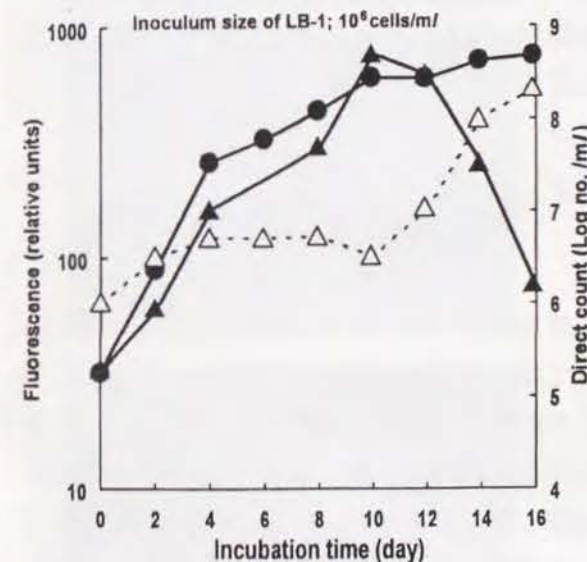
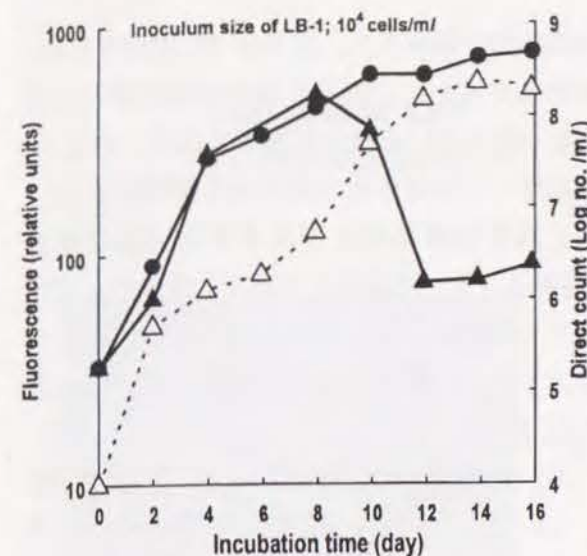


Fig. 2-25 Growth of *Lysobacter* sp. LB-1 in the co-culture with *Anabaena cylindrica* M-1 (IAM). Each point indicates the average of the duplicate.

- , Growth curve of *A. cylindrica* (not inoculated)
- ▲, Growth curve of *A. cylindrica* (LB-1 is inoculated)
- △, Growth curve of LB-1

始まったものと判断された。細菌の密度は、藍藻の溶解が全く観察されないにも拘らず、接種後すぐに増加して培養 4 日目には 10^6 cells/ml のオーダーを超えた、その後は増殖速度が低下したものの徐々に増加し、培養 8 日目には 7.0×10^6 cells/ml に達した。その後藍藻

細胞の溶解が始まると共に再び急激に増加し、培養 14 日目には 2.0×10^8 cells/ml に達したのち定常状態となった。一方、 1×10^6 cells/ml 接種区では、藍藻の溶解は培養 12 日目に初めて観察され、16 日目にはほとんどの藍藻細胞が溶解された。LB-1 株は接種後 4 日目までは増殖したがその後は定常状態となった（接種後 10 日目にはやや減少した）。その後藍藻の溶解が確認される直前から再び増殖し、藍藻細胞が完全に溶解された時点では 2×10^8 cells/ml の細胞密度に達した。

LB-1 株の溶存態有機物利用能

前項において、藍藻の溶解が観察されないにも拘らず、LB-1 株が接種後 2 日間程度で 10^6 cells/ml のオーダーまで増殖することが示された。このことは、同株が二者培養液に含まれる溶存態有機物を利用して増殖した可能性を示唆している。そこで、LB-1 株が *A. cylindrica* が代謝活動に伴い放出した細胞外有

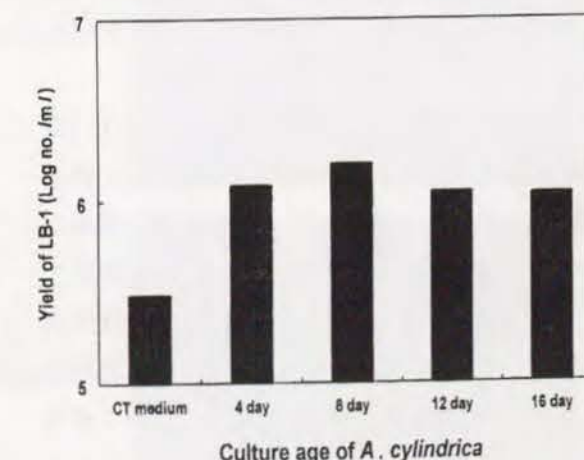


Fig. 2-26 Growth of *Lysobacter* sp. LB-1 when inoculated into culture filtrate of *Anabaena cylindrica* M-1 (IAM).

機物 (excreted organic matter ; EOM) を利用してどの程度まで増殖できるかについて検討した。その結果を、Fig. 2-26 に示す。

対照として、CT 培地に接種した区では、細菌はわずかに増殖し、培養 6 日目に 3.0×10^5 cells/ml の最大細胞密度に達した。藍藻の 4, 8, 12 及び 16 日目培養液に細菌を接種した区では、細菌はいずれの区においても対照区を越える増殖を示し、培養 6 日目にそれぞれ 1.2, 1.6, 1.1 及び 1.1×10^6 cells/ml の最大細胞密度に達した。

藍藻の培養日による溶解酵素に対する感受性の違い

前項までに得られた結果から、二者培養液中でおそらく EOM が枯渇したことにより LB-1 株の増殖が停滞した状況においても、なお *A. cylindrica* が定常期に達するまでその溶解が起きないことが示された。このことは、同株が対数増殖期の健康な *A. cylindrica* 細胞を溶解できない可能性を示唆している。そこで、対数増殖期の *A. cylindrica* 細胞が、LB-1 株の産生する藍藻溶解酵素に対して抵抗性を持つかどうかについて検討を行った。

培養 6 日目 (対数増殖期) と培養 10 日目 (定常期) の *A. cylindrica* の懸濁液に、LB-1 株の培養ろ液のタンパク質画分を 200 倍に濃縮して得た藍藻溶解酵素の粗酵素液を等量添加し、藍藻の細胞が溶解していく様子を経時的に微分干渉顕微鏡下で観察した。第 3 節において LB-1 株が複数の酵素の作用によって藍藻を溶解する可能性が示唆されていることから、本実験においては、精製した LB-1 Protease A プロテアーゼをあえて用いず、代りに粗酵素液を用いた。その結果を Fig. 2-27 に示す。

定常期 (培養 10 日目) の藍藻細胞については、粗酵素液の添加後 4 時間目にすでに糸状

体の破断が観察され、添加後 24 時間目には、糸状体は完全に分解して個々の細胞がばらばらに存在している様子が観察された。また、1 細胞ずつに分断された定常期の藍藻細胞は、同じ時間粗酵素液を作用させた対数増殖期 (培養 6 日目) の細胞と比べて、ややサイズが小さくなっていた。しかしながら、プロトプラスト化した藍藻細胞は観察されず、細胞壁は完全には溶解されないものと推定された。一方、対数増殖期 (培養 6 日目) の藍藻細胞については、粗酵素液の添加後 4 時間目に糸状体の破断が一部で観察されたものの、その後細胞の溶解はほとんど進行せず、添加後 32 時間目においても糸状体の構造は保たれていた。

考 察

滑走細菌による藍藻細胞の溶解の機作については、これまでも多数の報告がある。それらによると、溶解の機作は大きく 2 通りに分けることができる。1 つは細菌が藍藻細胞に接触して攻撃を行うというものであり、もう 1 つは細菌が藍藻細胞と接触することなく細胞外に溶解性物質を放出して藍藻を溶解するというものである。前者のタイプとしては、Shilo (1970) が、*Myxobacter (Lysobacter sp.)* FP-1 株を用いて、藍藻 *P. boryanum* に対する溶解の機作を光学顕微鏡下で観察し、細菌が 1 細胞ずつ単独で藍藻細胞に付着し、藍藻細胞を溶解させると報告している。また、Daft and Stewart (1971, 1973) は、*Myxobacter (Lysobacter sp.)* CP-1 株を用いて糸状体を形成する数種の藍藻に対する溶解の様子を顕微鏡下で観察し、やはり細胞同士の接触が必要であったと報告している。一方、後者のタイプとしては、Stewart and Brown (1971) が、*Myxobacter (Lysobacter*

Log phase cell (6-day culture)

Stationary phase cell (10-day culture)

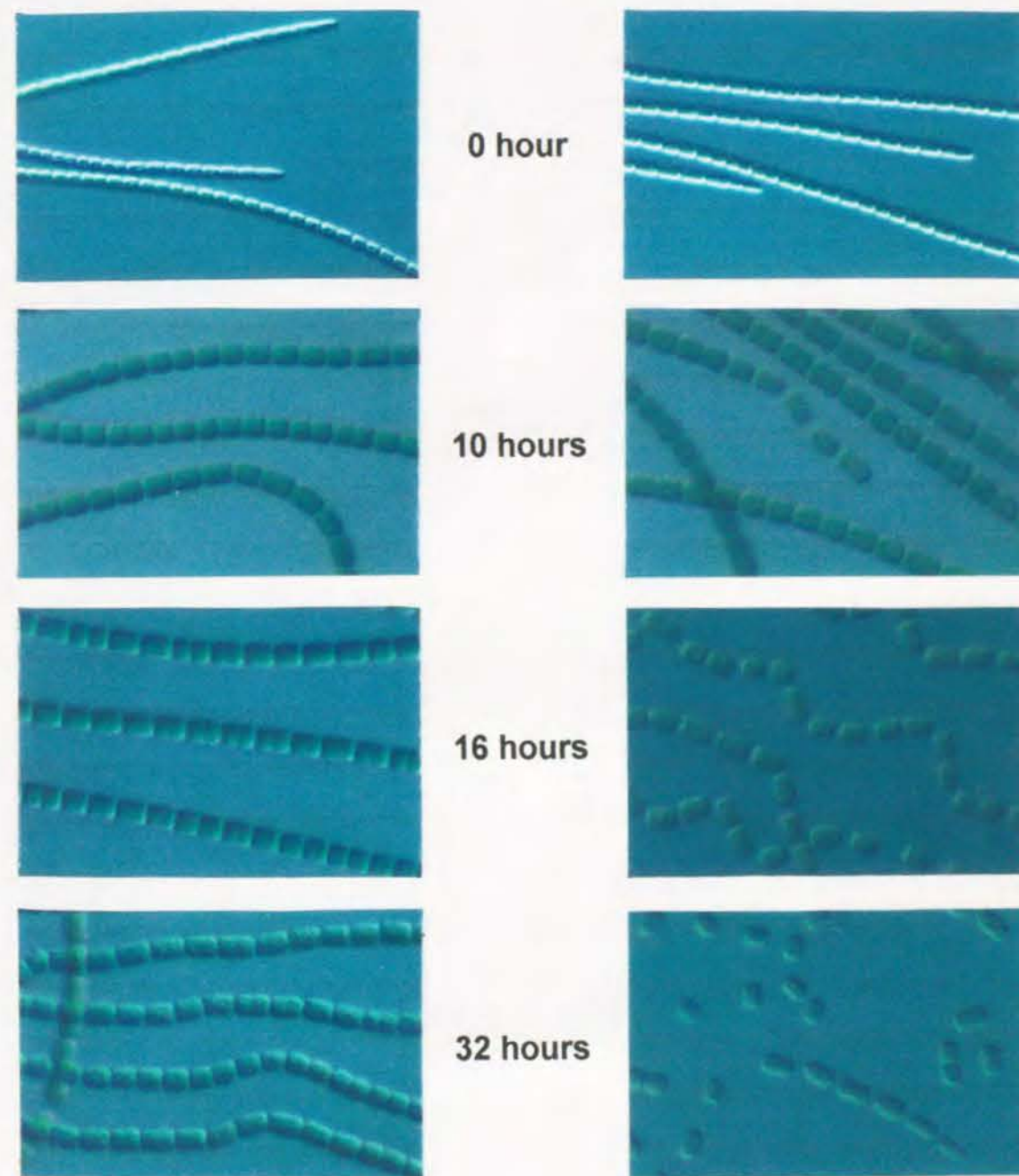


Fig. 2-27 Lysis of stationary phase cells of *Anabaena cylindrica* M-1 (IAM) by treatment with partially purified and concentrated (100-fold) cyanobacteria lytic enzyme excreted into the culture medium of *Lysobacter* sp. LB-1. Note that log phase cells of *A. cylindrica* is little affected by treatment with enzyme.

sp.) 44 株は、リゾチーム様の菌体外酵素を細胞外に放出し、藍藻を溶解すると述べている。

本研究では藍藻溶解性滑走細菌 *Lysobacter* sp. LB-1 株を藍藻 *A. cylindrica* と二者培養し、藍藻が溶解される様子を顕微鏡観察した。その結果、LB-1 株による *A. cylindrica* の糸状体の溶解過程は次のように推定された。まず LB-1 株は接触によって *A. cylindrica* の糸状体の一部の細胞を半ば溶解し、これを糸状体から切断する (Fig. 2-20)。半ば溶解され、ばらばらになった *Anabaena* 細胞の周囲で LB-1 株が増殖し、直径 $20\mu\text{m}$ 程度の小さな塊 (Fig. 2-21(A)と(B)) が形成される。この塊は、接触によって合体する (Fig. 2-21(D)) こと、及び塊の表面に糸状体をトラップして (Fig. 2-21(C)) これを取り込むことによってその大きさを増大させる。塊の表面では LB-1 株が急激に増殖し、それらの放出する藍藻溶解性物質 (プロテアーゼ) の作用によって塊内部の *Anabaena* 細胞は次第に溶解され消滅する。

このとき、塊の周囲に密集していた LB-1 株の細胞は、その先端部を固まりの中心に向けた状態で塊に付着していた。滑走細菌が固体表面に付着する際には、細胞先端部が重要な役割を果たしているようである。例えば、LB-1 株を含む単離菌がスライドガラスの表面に先端部を付着させ、付着した一端を支点として旋回運動を行う様子が、顕微鏡下でしばしば観察される。これに関して、滑走細菌の一種 *Myxococcus xanthus* が細胞の先端部に繊毛を持つという報告 (Dobson and McCurdy, 1979; Kaiser, 1979) がある。Dobson ら (1979) は、液体培地中で同細菌がクランプを形成しやすいのは、この繊毛の働きによるのだと述べている。また Kaiser (1979) は、繊毛を欠損した *M. xanthus* の変異株はフロックを形成せず、ガラス表面にも付着しなかったと述べている。

LB-1 株についても、先端部の繊毛によってスライドガラス表面や宿主の藍藻細胞などの固体表面に付着している可能性が考えられる。

顕微鏡観察では、LB-1 株が *Anabaena* の細胞に接触している様子こそ観察されたものの、接触が藍藻細胞を溶解するための必要条件なのかどうかは不明であった。そこで、接触の必要性を確かめる目的で、LB-1 株と *A. cylindrica* を孔径 $0.4\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターで隔てて培養し、*A. cylindrica* が溶解されるかどうかを調べたところ、細菌と藍藻の接触を許した対照区の *A. cylindrica* が培養 8 日目に溶解されたのに対し、接触を妨げた場合は 9 日目に至っても *A. cylindrica* は全く溶解されなかった (Fig. 2-22)。培養 9 日目の時点で LB-1 株の細胞密度を調べてみると、*A. cylindrica* が溶解された対照区では 10^8cells/ml のオーダーに達していたのに対し、メンブレンフィルターで *A. cylindrica* との接触を妨げた区では $1.6\times 10^6\text{cells/ml}$ に留まっていた。この LB-1 株の細胞密度は、Fig. 2-26 に示した培養 8 日目の *A. cylindrica* 無菌培養ろ液に LB-1 株を接種した場合の収量に相当する。LB-1 株はメンブレンを通過してきた *A. cylindrica* 由来の EOM を利用して 10^6cells/ml のオーダーまで増殖できたものと考えられる。このことは、物質は孔径 $0.4\mu\text{m}$ のメンブレンを通して自由に拡散していることを意味している。このことはまた、*A. cylindrica* の細胞が溶解するほど高濃度の溶解性物質 (プロテアーゼ) が培養液中に存在していないことも意味している。この実験では、10 日以上培養を続けると LB-1 株がメンブレンフィルターを通過してしまうため、培養を 9 日間で打ち切った。従って、LB-1 株は接触を妨げると *A. cylindrica* の細胞を溶解できないとは言いつれないが、少なくとも接触を妨

げると溶解の効率が著しく低下することは確かである。

以上の結果から、LB-1 株は藍藻細胞に接触して攻撃を行うタイプに属するものと判断される。しかしながら、藍藻の糸状体を接触によって切断したのち、ばらばらになった藍藻細胞を中心とした塊を形成し、その塊の周囲に密集してこれを溶解した点で、細菌が 1 細胞ずつ単独で藍藻の細胞を攻撃した *Myxobacter* FP-1 や CP-1 株の場合とは大きく異なっていた。子実体を作らない滑走細菌が塊を形成して藍藻を溶解したという報告は、本研究が最初であるが、子実体を作る *Myxococcus* 属細菌においては以前に報告されている。Burnham ら (1981, 1984) はアメリカ合衆国オハイオ州の排水溝から単離した *Myxococcus xanthus* PC02 株及び *Myxococcus fulvus* BG02 株が、本研究において観察されたような塊を形成し、そこに藍藻 *Phormidium luridum* をトラップして溶解したと述べている。*myxobacteria* などの子実体を形成する滑走細菌が集合して生活する性質をもつことは、良く知られている。Dworkin (1973) は、滑走細菌は集合することによって効率良い栄養摂取を行っているのだと述べている。*myxobacteria* はタンパク質、多糖類、ペプチドグリカンなどの高分子を、細胞外に放出した酵素で分解・低分子化して利用しているので、高い細胞密度を保つことは、分解酵素を効率良く作用させることができる点で、生存戦略上重要な意味を持つ。

固体表面でしか運動性を示さない滑走細菌にとって、水中は陸上と比べ、浮遊する宿主に自力で接近することができない点、また溶解酵素が拡散しやすい点で、過酷な環境であると思われる。Burnham (1981) は、藍藻溶解性細菌が水圏中で生残するための条件とし

て、1) 感受性を持つ宿主と遭遇すること、2) 宿主の藍藻を溶解するのに十分な溶解酵素濃度を維持すること、3) 増殖可能な量の遊離の栄養物を確保すること、の 3 つを挙げている。本研究において観察されたような、塊を形成して藍藻細胞を溶解するメカニズムでは、直径数百 μm にも達する塊の表面全体で宿主をトラップして集めることができる点、塊の内部が周囲から隔離されるために溶解酵素が拡散せず効率的な酵素作用が可能である点、また同じく隔離されているために溶解された藍藻細胞から溶出してくる低分子物質を水中に拡散しないうちに利用できる点で、上記の条件を満たしているものと考えられる。

本研究では、次に、液体培地中で LB-1 株と *A. cylindrica* を二者培養し、培養液中での両者の増殖パターンや *A. cylindrica* の溶解が起こる時期などについて検討した。その結果、LB-1 株を様々な培養齢の *A. cylindrica* に接種しても、*A. cylindrica* が定常期に達したのちにその溶解が起こることが示された (Fig. 2-23)。また、LB-1 株を 10^4 及び 10^6 cells/ml の初期密度となるようそれぞれ接種して二者培養を行うと、いずれの初期密度で細菌を接種した場合にも、*A. cylindrica* の溶解が起こるまでに同程度の誘導期間が存在すること、またやはり *A. cylindrica* が定常期に達したのちにその溶解が起こることが明らかとなった (Fig. 2-24)。一方、Burnham ら (1981) は、糸状体を形成する藍藻 *P. luridum* と藍藻溶解性滑走細菌 *M. xanthus* PC02 株を二者培養し、対数増殖中の藍藻に細菌を 10^4 cells/ml の初期密度で接種した場合には、藍藻の溶解までに 8 日間の誘導期間が生じたが、 10^5 及び 10^6 cells/ml の初期密度で接種した場合には、誘導期が見られず 1~2 日後には藍藻が溶解されたと述べている。

LB-1 株の場合には、*M. xanthus* PC02 株の場合に比較して、なぜこのように長い誘導期間を要するのだろうか。この点について検討するため、この誘導期間中に LB-1 株がどのような増殖を示しているのかを調べた。その結果、LB-1 株は $1 \times 10^4 \text{ cells/ml}$ の初期密度になるよう接種した場合には、*A. cylindrica* の溶解が認められる以前に、二者培養液中で 10^6 cells/ml のオーダーまで増殖していることが確認された (Fig. 2-25)。このことは、LB-1 株が二者培養液中に含まれる溶存態有機物を利用して増殖した可能性を示唆している。そこで、この可能性について確かめる目的で、様々な培養齢の *A. cylindrica* の無菌培養ろ液に LB-1 株を接種し培養したところ、*A. cylindrica* の無菌培養ろ液に含まれる LB-1 株が利用できる溶存態有機物の量は *A. cylindrica* の培養日数と共に増加して培養 8 日目に最大となり、その後はやや減少することがわかった (Fig. 2-26)。この結果から、*A. cylindrica* が増殖に伴って、培養液中に LB-1 株が利用できるような EOM を放出していることが確認された。*A. cylindrica* の EOM の主成分はガラクトースとグルコースを主要構成糖とする多糖類及びポリペプチドであるとされている (Walsby, 1974a, 194b; Chórst and Brzeska, 1978)。また、細菌が利用できる EOM は *A. cylindrica* の対数増殖期に放出されることが示唆されている (Chórst and Brzeska, 1978)。二者培養液中で、LB-1 株はこのような *A. cylindrica* が増殖に伴って放出する有機物を利用して増殖したのと考えられる。また、LB-1 株を培養 4 日目の *A. cylindrica* の無菌培養ろ液に接種した場合の収量 ($1.2 \times 10^6 \text{ cells/ml}$) が、同株を $1 \times 10^4 \text{ cells/ml}$ の初期密度で接種した二者培養において細菌が接種後 4 日目に到達した細胞密度 (Fig. 2-25) とほぼ一致していることから、細菌は *A. cylindrica* 培養液に接種さ

れたのち、まず EOM のみを利用して増殖したと判断できる。しかしながら LB-1 株の利用できる EOM は最大でも LB-1 株を $1.6 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 程度まで増殖させるだけの量しか放出されず、その放出は藍藻が対数増殖期後期に達すると停止した (Fig. 2-26) ことから、LB-1 株が 10^6 cells/ml のオーダーまで増殖したのち、いったん定常状態となったのは、EOM を利用し尽くしたためと説明できる。

EOM などの溶存態有機物が枯渇した状態で、LB-1 株がさらに増殖を続けるためには、別の有機物源が必要となる。その段階で初めて LB-1 株は *A. cylindrica* の細胞を溶解し、その結果生じた有機物を利用したのであろう。しかしながら、EOM が枯渇しても直ちに *A. cylindrica* が溶解されることはなく、なお数日間の誘導期が必要であったことから、その溶解には何らかのきっかけとなる要因がさらに必要なのではないかと考えられる。本研究では、二者培養において必ず *A. cylindrica* が定常期に達したのちに溶解が起こったことから、このきっかけが藻体自身にあるのではないかと考えられた。第 3 節で述べたように、LB-1 株をカシトンを含む CT 培地で培養すると、培養ろ液に *A. cylindrica* の細胞を溶解する活性を有するプロテアーゼが蓄積するので、この培養ろ液のタンパク質画分を濃縮したのち、これを培養 6 及び 10 日目の *A. cylindrica* 細胞に作用させ、その細胞の変化を微分干渉顕微鏡下で経時的に観察した。その結果、定常期 (培養 10 日目) の細胞については、藍藻溶解酵素の作用によって数時間後から糸状体が切断され 24 時間後には各細胞がばらばらに分断されてしまったのに対し、対数増殖期 (培養 6 日目) の細胞は、32 時間後にも糸状体の構造を保っていた (Fig. 2-27)。この結果は、*A. cylindrica* の細胞は生理状態の良い対数増殖期

にはLB-1株の産生するプロテアーゼの作用を受けにくい、定常期に入ると作用を受けやすくなることを示唆している。1細胞ずつに分断された定常期の細胞は、ほとんど溶解されていない対数増殖期の細胞と比べて、ややサイズが小さくなっており、細胞壁がプロテアーゼの作用によって溶解されていると考えられるが、プロトプラスト化した細胞は見られなかったことから、細胞壁は完全には溶解されていないものと思われる。藍藻の細胞壁はグラム陰性細菌のそれに近い構造を持っているとされている(Drews and Weckesser, 1982)。今後は、透過型電子顕微鏡を用いた観察などによって、プロテアーゼによって細胞壁のどの部位が溶解されているのか、また対数増殖期と定常期の細胞で細胞壁の構造に違いがあるのかどうかなどの点について検討する必要がある。

以上の結果から、二者培養における藍藻溶解の機作をまとめると、次のようになる。LB-1株は、*A. cylindrica*の培養液に接種されると、まず藍藻の増殖に伴って放出されるEOMを利用して 10^6 cells/mlのオーダーまで増殖する。その後EOMを利用し尽くして次の有機物源を求めるが、*A. cylindrica*の代謝が活発な対数増殖期にはその細胞がLB-1株の産生するプロテアーゼに対する抵抗性を持つためにこれを溶解できず、LB-1株の増殖は停滞し定常状態となる。その後、*A. cylindrica*が定常期に入るとその生理状態が悪くなると、何らかの理由によりその細胞がプロテアーゼの作用を受けやすくなり、溶解が始まる。いったん溶解が始まり塊が形成されると、溶解された細胞から溶出した有機物を利用して塊の周囲でLB-1株が急激に分裂増殖し、その結果より高濃度の溶解酵素が生産され、その作用によって*A. cylindrica*細胞の溶解がますます進み、またそ

れがLB-1株の増殖につながるという連鎖的な作用を生む。また、塊はあらたに*A. cylindrica*の糸状体をトラップしたり、塊同士が合体したりすることによってその直径を増大させる。その結果、いったん溶解が始まると、溶解は加速度的に進行し、*A. cylindrica*は急激に消滅する。このように、LB-1株がその溶解作用を発揮するには、宿主側の藍藻の生理状態の悪化が必要であるところから、LB-1株は糸状体を形成するNostocales目の藍藻に対して、日和見感染的な病原性をもつということができのではないだろうか。

最後に、このような活性を持つ藍藻溶解性滑走細菌が、湖沼において発生する藍藻のブルームの消滅に関与しているのかどうかについて考えてみたい。Fallon and Brock (1979a, 1979b)は、アメリカ合衆国ウィスコンシン州のメンドータ湖において、藍藻溶解性細菌の現存量が 10^3 cells/ml程度であることから、同湖におけるMicrocystis属やAnabaena属藍藻のブルームの消滅には、藍藻溶解性細菌の作用よりも、藍藻自身の生理状態の悪化による自己溶解のほうが重要な役割を果たしていると結論している。また、Fraleigh and Burnham (1988)は、*M. fulvus* BG02株を藍藻Nostoc muscorum及び*P. luridum*と二者培養すると、細菌を 5×10^6 cells/ml以上の初期密度で藍藻に接種すると藍藻の溶解が起こるが、それ未満の初期密度では、栄養物濃度の高い培地では溶解の開始までに誘導期間が生じ、栄養物濃度が低い培地では溶解が起こらないことを見出した。この結果から、彼らは滑走細菌が藍藻の溶解を引き起こすには、少なくとも 10^6 cells/ml以上の細菌密度が必要であると結論し、湖沼において報告されている藍藻溶解性滑走細菌の現存量である $<10^3$ pfu/ml (Daft et al., 1975)は、藍藻のブルームの顕著な消滅を引き起こ

すには不十分ではないかと述べている。彼らは二者培養液中における細菌の密度や増殖パターンを見ていないので、藍藻の溶解が始まった時点でBG02株がどの程度の細胞密度に達していたのかはわからないが、本研究の二者培養においても、*A. cylindrica*の溶解が始まる時点でのLB-1株の細胞密度は 10^6 cells/mlを越えており、少なくともバッチ培養系においては、藍藻の溶解を引き起こすにはこの程度の細菌密度が必要なのであろう。確かにこの密度は、本研究で琵琶湖及び諏訪湖において得られた藍藻溶解性微生物の現存量(藍藻溶解性滑走細菌の現存量とみなすことができる)の最大値である 10^4 pfu/ml(琵琶湖矢橋定点を除く)と比べても、まだ2オーダー高い。しかしながら、第1節においても論じたように、重層寒天平板法で得られた値は実際の現存量よりも低くなっている可能性が高く、今後より感度の高い検出法、例えば蛍光抗体やDNAプローブを用いて藍藻溶解活性を持つ細菌を検出する方法が開発されれば、より高い現存量が得られるのではないだろうか。従って、現在報告されている現存量が、バッチ培養で藍藻を溶解するのに必要な細菌密度より低いというだけで、藍藻溶解性細菌が藍藻ブルームの消滅に関与していないと結論付けるのは早すぎるように思われる。琵琶湖及び諏訪湖において、藍藻ブルームの出現に伴って、ブルーム形成種に対する溶解活性を持つと考えられる滑走細菌が増加してくること、この滑走細菌は藍藻が活発に増殖している間は藍藻の放出するEOMを利用して増殖できること、藍藻の生理状態が悪くなるとこれを効率良く溶解・利用する能力を持っていることを考えあわせると、滑走細菌は藍藻ブルームの消滅を加速させる働きをしているのではないかと推察される。すなわち、滑走細菌が存在

していなくても藍藻のブルームは藍藻自身の生理状態の悪化によって徐々に消滅するはずであるが、滑走細菌が存在しているとその消滅が急激に生じるのではないだろうか。

第5節 摘要

(1) 1985年に、藍藻*A. solitaria*のブルームが夏季に出現する琵琶湖において、同じAnabaena属の*A. cylindrica*を宿主に用いた重層寒天平板法によって藍藻溶解性微生物の現存量調査を行ったところ、その表層水中における現存量は*A. solitaria*の現存量及びクロロフィルa量と平行な変動パターンを示し、9月上旬の*A. solitaria*のブルーム時には 10^4 pfu/ml以上に達した。

(2) 1985年に、藍藻*M. aeruginosa*のブルームが夏季に出現する諏訪湖において*A. cylindrica*を宿主に用いて藍藻溶解性微生物の現存量調査を行ったところ、その表層水中における現存量は $10^1 \sim 10^2$ pfu/mlと低く、*M. aeruginosa*のブルームやクロロフィルa量の増減との間に相関は見られなかった。一方、1986年に、同じ諏訪湖においてブルーム形成種と同じ*M. aeruginosa*を宿主に用いて藍藻溶解性微生物の現存量調査を行ったところ、その表層水中における現存量はクロロフィルa量と平行な変動パターンを示し、8月の*M. aeruginosa*のブルーム時には 10^4 pfu/mlに達した。

(3) 琵琶湖及び諏訪湖での調査において、重層寒天平板上に出現したプラークの原因微生物は、わずかな例外(アメーバと糸状菌)を除き、殆どが滑走細菌であった。

(4) 分離した藍藻溶解性滑走細菌の宿主特異性を調べたところ、*A. cylindrica*を宿主に用いて分離した菌は、宿主と同じNostocales目の藍藻に対して、*M. aeruginosa*を宿主に用いて分

第3章 沿岸海域に分布する珪藻溶解性細菌の生理生態

離した菌は、宿主と同じ Chroococcales 目の藍藻に対して、それぞれ特異的な溶解性を示す傾向が見られた。

(5) 琵琶湖から分離した藍藻溶解性滑走細菌 *Lysobacter* sp. LB-1 株をカシトン 0.5% を添加した CT 培地で培養し、定常期の培養液から藍藻溶解活性を持つプロテアーゼの精製を試みた。硫酸塩析、Q-Sepharose Fast Flow 陰イオン交換クロマトグラフィー、Mono S 陽イオン交換クロマトグラフィー (1 回目)、Phenyl-Superoose ハイドロフォービッククロマトグラフィー、Mono S 陽イオン交換クロマトグラフィー (2 回目) 及び Superose 6 ゲルろ過のステップを経て、電気泳動的に単一のバンドを示すまでプロテアーゼ (LB-1 protease A) を精製した。これは藍藻溶解活性を保持したセリンプロテアーゼで、分子量は 32,000 ダルトン、至適 pH は 10~11 と極めてアルカリ側にあるという特徴を有していた。

(6) *Lysobacter* sp. LB-1 株と *A. cylindrica* M-1 (IAM) 株を二者培養し、滑走細菌による藍藻

溶解の過程を顕微鏡下で観察したところ、LB-1 株が *A. cylindrica* の糸状体を切断し、ばらばらになった *Anabaena* の細胞を中心にしてその周囲に密集した塊状のコロニーを形成して、効率良くこれを溶解することが明らかになった。

(7) *Lysobacter* sp. LB-1 株は、*A. cylindrica* の培養液に接種すると、まず藍藻が増殖に伴って培養液中に放出する有機物 (EOM) を利用して、藍藻細胞を溶解することなく 10^6 cells/ml のオーダーまで増殖した。その後 EOM が枯渇すると、LB-1 株の増殖はいったん停滞したが、藍藻が定常期に入ると、LB-1 株はその細胞を溶解・利用して再度増殖して 10^8 cells/ml のオーダーに達した。

(8) *A. cylindrica* M-1 (IAM) 株の対数増殖期の細胞が *Lysobacter* sp. LB-1 株の産生する藍藻溶解活性を持つプロテアーゼに対して抵抗性を示すのに対し、定常期の細胞は比較的容易に溶解されることが明らかになった。

浮遊珪藻類は海域に広く分布しており、通常春季や秋季にブルームを形成するが、有明海においては 1 月から 3 月にかけての冬季にもしばしば大増殖して赤潮状態となり、ノリの「色落ち」現象を引き起こし、養殖業に大きな被害を与えている。これは、赤潮を形成した珪藻が栄養塩を大量に消費する結果、海水中の栄養塩濃度が急激に低下し、そのためにノリが栄養失調となって退色する現象である。この冬季に発生する珪藻赤潮の発生・消滅の原因としては、塩分濃度 (切田ら, 1991) の影響が挙げられているが、その消長のメカニズムが完全に解明されているわけではない。第 2 章で述べた藍藻のブルームの場合と同様に、藻類と微生物との相互作用も赤潮の発生・消滅に影響を及ぼしているのではないかと考えられる。

珪藻類を殺す微生物に関しては、初期生物飼料として養殖場などで大量培養されている珪藻類が、培養中に急激に死滅する現象が知られている。この時、珪藻殺滅活性を持つ *Pseudomonas* 属細菌 (Baker and Herson, 1978) や *Saprospira* 属細菌 (Sakata, 1990) が培養槽中に存在しており、これらの作用によって珪藻が死滅したのではないかと考えられている。沿岸海域において発生する珪藻赤潮についても、その消滅段階においてこのような活性を持つ細菌が関与している可能性がある。

近年、赤潮藻類溶解活性もしくは殺滅活性を持つ様々な細菌群が、沿岸海域に分布することが明らかにされつつある。西日本の沿岸海域においてハマチの養殖業に被害を与えているラフィド藻 *Chattonella antiqua* を殺滅する細菌として、*Cytophaga* 属 (Imai et al., 1991, 1993; 古城, 1992), *Vibrio* 属 (Ishio et al., 1989)

及び *Alteromonas* 属細菌 (Imai et al., 1995) が単離されている。渦鞭毛藻 *Gymnodinium mikimotoi* を殺滅する細菌としては、*Flavobacterium* 属 (Fukami et al., 1992), *Alteromonas* 属細菌 (菅原ら, 1993) 及び暫定的に *Flavobacterium* 属と同定された海洋細菌 (Yoshinaga et al., 1995) が単離されている。

珪藻についても、これを殺滅する細菌として、滑走細菌の *Saprospira* 属 (Sakata et al., 1991; Sakata and Yasumoto, 1992) と *Vitreoscilla* 属 (Sakata and Iwamoto, 1995) 及び真正細菌の *Alteromonas* 属 (坂田, 1994) 細菌が、鹿児島県の沿岸海域から単離されている。また、*G. mikimotoi* を殺滅する *Alteromonas* に属する細菌が珪藻 *Chaetoceros didymum* と *Ditylum brightwellii* をも殺滅することも報告されている (Imai et al., 1995)。しかしながら、現場海域におけるこれらの細菌の現存量や、これらと珪藻赤潮との関連性などについては、ほとんど知見が得られていない。また、これらの細菌が珪藻を殺滅する作用機作については、*Saprospira* 属細菌は接触によって *Chaetoceros calcitrans* を殺滅するが、その際殺滅された *C. calcitrans* の細胞が凝集し、その凝集塊の周辺で細菌が増殖する (Sakata, 1990) と、また *Alteromonas* 属細菌が細胞外に酢酸エチルで抽出できる水溶性物質によって珪藻を殺滅する (坂田, 1995) とそれぞれ報告されているが、それらの機作はまだ完全には解明されていない。

本章においては、有明海に分布する珪藻溶解性細菌の生理生態を明らかにすることを目的とした。第 1 節では、有明海において、珪藻赤潮がノリ養殖に被害を与えている冬季に従属栄養細菌相を調査することによって、珪

藻赤潮の消長に關与する細菌群を明らかにしようと試みた。第2節では、有明海における珪藻溶解性微生物の現存量を重層寒天平板法によって調査し、それらと珪藻赤潮との關係を調べた。また珪藻溶解性細菌を単離して、それらの簡易同定及び宿主特異性の検討を行った。第3節では、単離菌の持つ珪藻溶解作用機作について詳細に検討を行った。

第1節 有明海における従属栄養細菌相の変動

緒言

沿岸海域において發生する微細藻類のブルーム時には、従属栄養細菌の現存量が増加すると共に、その細菌相が単純化し、特定の細菌群が優占する傾向が見られると報告されている (Riquelme *et al.*, 1987)。そこで、本節では、有明海において冬季に發生する珪藻赤潮の發生前後に、一般従属栄養細菌の細菌相がどのように変化するかを調べることで、珪藻赤潮の消長に關与する細菌の存在の可能性を探ろうとした。

材料及び方法

調査定点及び採水

有明海福岡県地先のノリ漁場海域に調査定点を設定した (Fig. 3-1)。このうち定点22及び24において従属栄養細菌相の調査を行った。調査は1989年12月20日から1990年2月28日までの間、計6回行った。海水を表層 (0m) 及び底層 (海底から1m上層) から採取したのち、直ちに滅菌したガラスビンに入れて実験室まで持ち帰った。水温については棒状水温計を、塩分についてはサリノメーターを用いて現場

で測定した。クロロフィルa量については、試水を実験室まで持ち帰ったのち、蛍光法 (Yentsch and Menzel, 1963) により測定した。なお、採水及び環境諸要因の測定については、福岡県有明海研究所のご厚意により、同研究所が担当して行い、得られたデータを利用して頂いた。

従属栄養細菌の計数、単離及び同定

従属栄養細菌の生菌数は、 $ST10^{-1}$ 培地 (tripticase (BBL), 0.5g; yeast extract (Difco), 0.05g; agar, 12g; aged sea water 1l) を用い、混和法により計測した。1試水につき約30株の従属栄養細菌を計数に用いたプレートから無作為に単離し、常法 (絵面, 1990) に従い簡易同定した。なお、単離は、有明海研究所のご厚意により、同研究所が担当して行った。

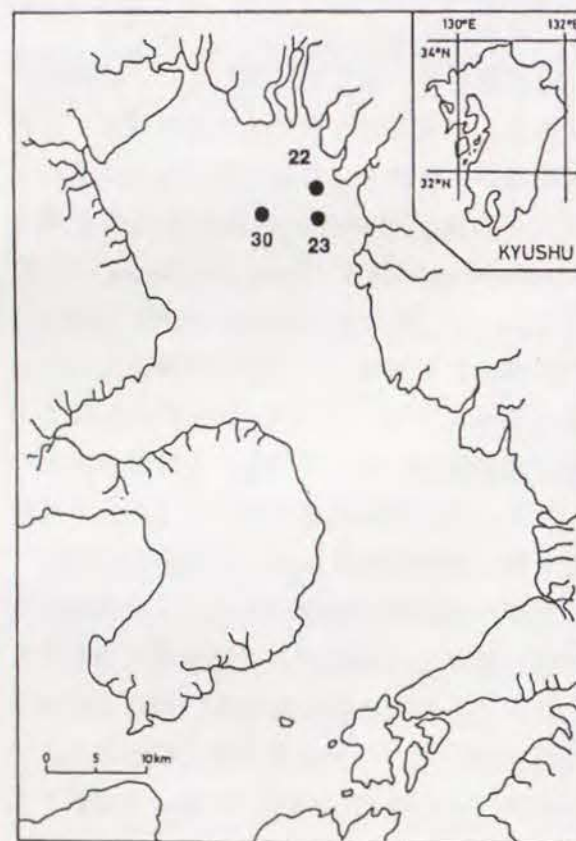


Fig. 3-1 Location of sampling stations in the Ariake Sea.

宿主に用いた微細藻類

宿主に用いた微細藻類のうち、珪藻 *Skeletonema costatum* NIES-324株及びラフィド藻 *Chattonella antiqua* NIES-1株は、国立環境研究所 (NIES) より入手した。珪藻 *S. costatum*, *Thalassiosira* sp., *Chaetoceros didymum*, *Ditylum brightwellii* 及び渦鞭毛藻 *Gymnodinium mikimotoi* G303-AX2株については、水産庁南海区水産研究所の山口峰生博士から、ご厚意により分与して頂いた。これらは全て無菌培養株である。

これらの藻類を、培地に改変SWM-III培地 (Table 3-1) を用い、珪藻については15°C、*C. antiqua*と*G. mikimotoi*については25°Cのそれぞれインキュベーターに入れ、 $35\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (12L:12D) の白色光を照射しながら経代培養した。

珪藻 *S. costatum* に対する溶解活性の検討

改変SWM-III培地で対数増殖期まで培養した *S. costatum* NIES-324株の培養液を、同培地で希釈したのち、滅菌したポリプロピレン製キャップ付試験管 (13×105mm) に4mlづつ分注した。 $ST10^{-1}$ 液体培地に接種して25°Cで48~72時間培養した単離した各従属栄養細菌の培養液各0.1mlを、*S. costatum*の希釈培養液を分注した試験管にそれぞれ接種した。これを15°Cのインキュベーター中で $35\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (12L:12D) の白色光を照射しながら培養した。1~2週間培養したのち、光学顕微鏡下で *S. costatum* の細胞の様子を観察し、細胞の溶解が認められた場合、溶解活性ありと判定した。

宿主特異性の検討

改変SWM-III培地で対数増殖期まで培養した7種の微細藻類の培養液を、それぞれ同培地で希釈したのち、滅菌したポリプロピレン製

Table 3-1 Composition of Modified SWM-III medium.

NaNO ₃	170	mg
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	15.6	mg
Na ₂ SiO ₃	24.4	mg
Na ₂ EDTA	11.17	mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.54	mg
TRIS	500	mg
P-1 Metals ^{*1}	10	ml
S-3 Vitamins ^{*2}	2	ml
Aged sea water	up to 1,000	ml
pH	7.75	
^{*1} : P-1 Metals		
H ₃ BO ₃	6.183	g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	692.5	mg
ZnCl ₂	54.5	mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2.38	mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	17	μg
Aged sea water	up to 1,000	ml
^{*2} : S-3 Vitamins		
Vitamin B ₁	50	mg
Calcium pantothenate	10	mg
Nicotinic acid	10	mg
p-Aminobenzoic acid	1	mg
Biotin	100	μg
Inositol	500	mg
Sericulture	200	μg
Thymine	300	mg
Vitamin B ₁₂	100	μg
Deionized water	up to 200	ml

キャップ付試験管 (13×105mm) に4mlづつ分注した。0.1%カシトン (Difco) を添加した改変SWM-III培地で対数増殖期まで培養した単離菌の培養液を、改変SWM-III培地で適当に希釈したのち、その0.1mlを各微細藻類の希釈培養液を分注した試験管に接種した。この時、単離菌の初期密度を、およそ 1×10^4 cells/mlとした。珪藻培養液に接種した試験管については15°Cのインキュベーターに、*C. antiqua*と*G. mikimotoi*の培養液に接種した試験管については25°Cの、それぞれインキュベーターに入れ、 $35\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (12L:12D) の白色光を照射しながら培養した。1~2週間培養したのち、光学顕微鏡下で微細藻類の細胞の様子を観察し、細

胞の溶解が認められた場合、溶解活性ありと判定した。

結果

環境諸要因と全従属栄養細菌数の変動

1989年12月20日から1990年2月28日にかけての調査期間中の、定点22及び24における水温、塩分、クロロフィルa量及び全従属栄養細菌数の変動をTable 3-2に示す。水温は、いずれの定点及び水深においても12月の調査開始時から徐々に低下し、1月31日に最低水温を示したが、2月にかけて徐々に上昇した。塩分は、調査期間を通じてあまり変動しなかったが、表層水については定点22の方が定点24よりも0.5~0.8程度低い値を示した、また定点22では表層水は底層水よりも0.2~0.3程度低い値を示した。クロロフィルa量は、定点

22では4.5~15.5 $\mu\text{g/l}$ の範囲で、定点24では2.6~10.9 $\mu\text{g/l}$ の範囲で変動し、定点24の底層水を除いて1月31日に最大値を示したが、これは*S. costatum*を主要原因種とする小規模な珪藻ブルームの発生によるものであった。全従属栄養細菌数は、定点22では $5.9 \times 10^2 \sim 6.0 \times 10^3 \text{ cfu/ml}$ の間で変動し、定点24では $5.0 \times 10^1 \sim 2.5 \times 10^3 \text{ cfu/ml}$ の間で変動したが、定点22の方が常に高い値を示した。

従属栄養細菌相の変動

調査期間中の定点22及び24における細菌相の変動を、それぞれFig. 3-2及び3-3に示す。調査期間中に単離された全627株の従属栄養細菌のうち204株が*Flavobacterium*属細菌であり、両定点のいずれにおいても1990年1月31日以降に同属細菌が優占(最大60%まで)していたことが特徴的であった。*Moraxella*属及び

Table 3-2 Changes of various environmental factors and viable counts of heterotrophic bacteria at two stations in the Ariake Sea in 1989-1990.

Station No.	Depth (m)			Sampling Date					
				Dec. 20	Jan. 9	Jan. 17	Jan. 31	Feb. 13	Feb. 28
22	0	Water Temp.	(°C)	12.7	10.1	10.2	9.5	11.1	12.1
		Salinity		30.40	30.43	30.30	30.56	30.81	30.76
		Chlorophyll-a	($\mu\text{g/l}$)	4.5	8.8	5.1	12.2	10.5	4.8
		Viable Bacterial Count	(CFUs/ml)	1.3×10^3	2.5×10^3	6.0×10^3	4.7×10^3	2.4×10^3	5.9×10^2
	B-1	Water Temp.	(°C)	12.6	10.2	10.2	9.5	11.3	11.9
		Salinity		30.67	30.62	30.48	30.79	30.99	31.06
		Chlorophyll-a	($\mu\text{g/l}$)	4.9	9.4	4.9	15.5	12.0	4.9
		Viable Bacterial Count	(CFUs/ml)	9.5×10^2	2.8×10^3	5.3×10^3	3.5×10^3	3.5×10^3	7.3×10^2
24	0	Water Temp.	(°C)	14.0	10.8	10.7	10.3	11.3	12.1
		Salinity		31.13	31.08	30.86	31.32	31.36	31.45
		Chlorophyll-a	($\mu\text{g/l}$)	2.6	5.4	3.4	10.9	10.2	4.0
		Viable Bacterial Count	(CFUs/ml)	5.0×10^1	2.5×10^3	1.1×10^3	5.2×10^2	4.5×10^2	3.7×10^2
	B-1	Water Temp.	(°C)	ND	11.0	10.7	10.2	11.2	12.1
		Salinity		ND	ND	31.02	31.00	31.54	30.94
		Chlorophyll-a	($\mu\text{g/l}$)	ND	6.0	4.6	10.3	10.8	4.4
		Viable Bacterial Count	(CFUs/ml)	1.6×10^2	8.1×10^2	8.1×10^2	4.2×10^2	6.6×10^2	1.0×10^2

ND: Not Determined

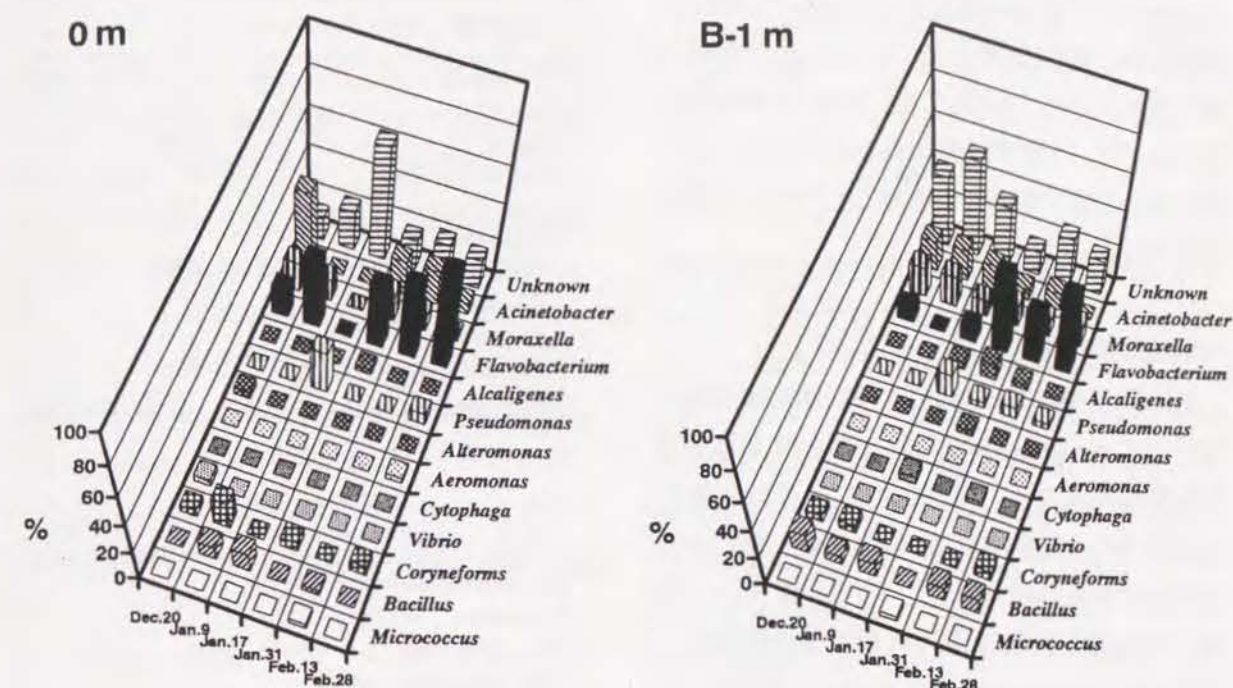


Fig. 3-2 Changes of bacterial flora in surface and bottom waters at station 22 in the winter of 1989-1990.

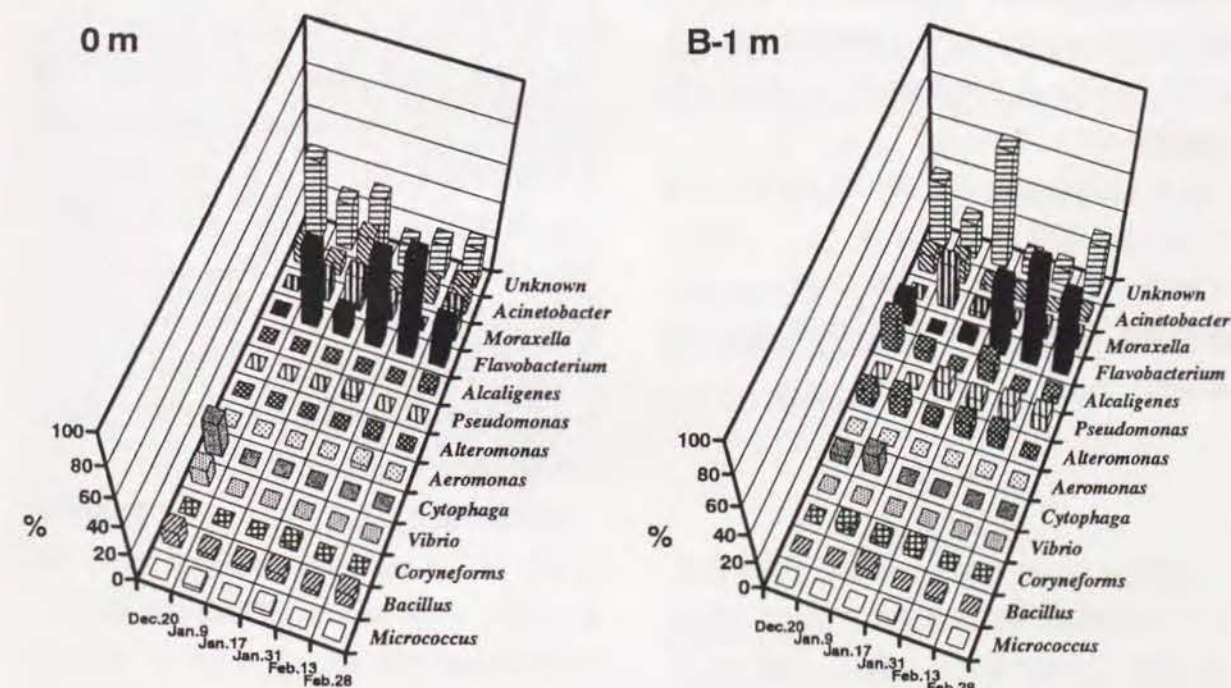


Fig. 3-3 Changes of bacterial flora in surface and bottom waters at station 24 in the winter of 1989-1990.

*Acinetobacter*属細菌はそれぞれ69株と68株が単離され、調査期間を通じてコンスタントに検出された。これに対して、*Vibrio*属細菌は非常に少なく、2株が単離されたのみであった。残りの165株は単離後に死滅したため、同定が不可能であった。

珪藻溶解性細菌のスクリーニング

簡易同定を行った 462 株の従属栄養細菌について *S. costatum* NIES-324 株に対する溶解活性を調べたところ、1990 年 2 月 13 日に定点 22 の底層水から単離された 1 株 (A5Y 株) のみが強い溶解活性を示した。同株はオレンジ色の菌体色素を持ち滑走運動を行う長桿菌で、HPLC 法 (Katayama-Fujimura *et al.*, 1984) によって求めた G+C 含量が 32.7% であることから、*Cytophaga* 属と同定された (Table 3-3)。一方、3 株の *Flavobacterium* 属細菌と 1 株の *Alteromonas* 属細菌が *S. costatum* の増殖をやや抑制する活性を示したが、顕微鏡下で観察したところ、これらの単離菌は *S. costatum* の細胞を溶解していなかった。

また、*Cytophaga* sp A5Y 株の宿主特異性を調べたところ、3 種 4 株の珪藻及びラフィド藻の *C. antiqua* を溶解したが、珪藻 *C. didymum* 及び渦鞭毛藻 *G. mikimotoi* を溶解できなかった (Table 3-4)。

考 察

本研究において1989～1990年に定点を設定した有明海福岡県沿岸海域は、有明海の最奥部、筑後川の河口付近に位置し、筑後川を通じて栄養塩が豊富に供給される、極めて富栄養化した海域である。一般に、海域の汚濁・富栄養化の進行に伴って、*Vibrio*属細菌の比率が減少し、*Acinetobacter*-*Moraxella*属細菌が増

Table 3-3 Some taxonomical characteristics of *Cytophaga* sp. A5Y.

Gram-stain	-
Motility	Gliding
Shape	Long rod
Size (μm)	0.5 ×5~8
Flagellum	-
Colony color	Orange
OF-test	-
DNAse	+
Oxidase	-
G+C ratio	32.7

Table 3-4 Host specificity of *Cytophaga* sp. A5Y.

<i>Skeletonema costatum</i> NIES-324	+
<i>S. costatum</i>	+
<i>Thalassiosira</i> sp.	+
<i>Chaetoceros didymum</i>	-
<i>Ditylum brightwellii</i>	+
<i>Chattonella antiqua</i> NIES-1	+
<i>Gymnodinium mikimotoi</i> G303-AX2	-

加するとされている (Ishida and Kadota, 1974, 1975; 石田, 1982; Shimidu *et al.*, 1987)。本調査においても、*Acinetobacter*と*Moraxella*属細菌が調査期間を通じて検出されたのに対し、*Vibrio*属細菌は極めて少なかったのが特徴的であった。しかしながら、*Acinetobacter*属と*Moraxella*属細菌の比率は、*S. costatum*のブルームの消長に関連した変動を示さなかったことから、これらの属の細菌は珪藻赤潮に依存した生態を持っていないと考えられる。

細菌相の変化として、もう一つの特徴的であったのは、*S. costatum*の小規模なブルームの発生時に、*Flavobacterium*属細菌の比率がブルーム発生以前と比べ明らかに上昇し、最高60%まで達したことであった。このことは、同属の細菌が珪藻赤潮に依存した生態を持つ可能性を示唆している。Sieburth (1968) は、ナラガンセット湾において、植物プランクトンと

海洋細菌相の季節変動を調べ、やはり珪藻のブルームと*Flavobacterium*属細菌との間に相関関係が見られたと報告している。また、珪藻と*Flavobacterium*属細菌が、互いの代謝産物を利用し合って増殖するという報告もなされている (Riquelme *et al.*, 1988)。珪藻赤潮の発生時には、同属の細菌が珪藻の代謝産物を利用して増殖してくる結果、優占種となっているのではないかと推察される。しかしながら、単離された*Flavobacterium*属細菌204株がいずれも*S. costatum*に対する溶解活性を示さなかったことから、現場において発生していた*S. costatum*のブルームの消滅に、同属の細菌は関与していなかったと考えられる。

珪藻溶解性細菌のスクリーニングという点では、1989～1990 年における収穫は極めて少なく、簡易同定を行った 462 株の従属栄養細菌中、強い珪藻溶解活性を示したのは 1 株 (*Cytophaga* sp. A5Y 株) のみであった。しかしながら、このことから直ちに、現場海域に珪藻溶解性細菌がほとんど存在していない、と結論づけることはできない。従属栄養細菌の分離に用いた ST10⁻¹ 培地が、珪藻溶解性細菌の増殖に適していなかったために、これらを検出できなかった可能性も考えられる。珪藻溶解性細菌の現存量については、これらの細菌をその溶解活性によって検出できるバイオアッセイ法を用いて、さらに詳しく調査する必要があると考え、第 2 節において検討を行った。

第2節 有明海における珪藻溶解性細菌の現存量とその季節変動

緒 言

微細藻類溶解性細菌をその溶解活性によって検出・計数するためのバイオアッセイ法としては、MPN 法と重層寒天平板法がよく用いられている。このうち、第 2 章第 1 節においても用いた重層寒天平板法は、宿主に用いる微細藻類が軟寒天中で良好な増殖を示す場合にのみ適用できるため、寒天中で生育できないラフィド藻 *C. antiqua* や渦鞭毛藻 *G. mikimotoi* を宿主に選んだ場合には、MPN 法が主に用いられている (今井, 1992; Yoshinaga *et al.*, 1995b)。珪藻については、軟寒天中でも増殖可能な株が存在するため、どちらの方法も適用可能である。しかしながら、同一試水について、両者の方法によって珪藻溶解性細菌数を求めると、重層寒天平板法の方が MPN 法よりも常に高い計数値が得られることがわかっている (満谷, 1992)。そこで、本節においては、軟寒天中で良好な増殖を示す珪藻 *S. costatum* NIES-324 株を宿主に用いた重層寒天平板法によって、有明海沿岸海域に分布する珪藻溶解性微生物の現存量を把握し、その季節変動と珪藻赤潮の消長との関連性を明らかにしようとした。

材料及び方法

定点及び採水

福岡県有明海地先に3定点 (Fig. 3-1) を定め、その表層及び底層 (海底より1m上層)の2層から採水を行った。調査は、1992年から1994年の冬季並びに1994年の夏季から1995年の冬季

にかけて行った。採水は福岡県有明海研究所のご厚意により同研究所が担当して行った。試水は滅菌したショットビンにとり、5℃に保って研究室まで輸送し、採水翌日に試験に用いた。

植物プランクトンの現存量の測定

クロロフィルa量については、試水を実験室まで持ち帰ったのち、蛍光法 (Yentsch and Menzel, 1963) により測定した。プランクトン沈殿量については、プランクトンネットの鉛直引き (海底から表層まで) によってプランクトン試料を採取し、沈殿法により測定した。珪藻赤潮が出現した場合には、顕微鏡観察により優占種の同定を行った。なお珪藻赤潮が出現した場合には、船上から目視観察を行い、海水の着色が認められた間を赤潮出現期間とした。これらの項目については、福岡県有明海研究所のご厚意により、同研究所が担当して測定・観察を行い、得られたデータを利用させて頂いた。

宿主珪藻及びその前培養

宿主藻として無菌培養の珪藻 *S. costatum* NIES-324株を用いた。50mlの改変SWM-III培地を入れた100ml容の三角フラスコに *S. costatum* を接種した。これを15℃のインキュベーター中で $35\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (12L:12D) の白色光を照射しながら1週間静置培養した。

珪藻溶解性微生物の現存量の測定

藍藻溶解性微生物の計数に用いたのと同様の重層寒天平板法を藍藻の代りに珪藻を用いて行い (Fig. 2-3), 珪藻溶解性微生物の計数を行った。表層と底層 (海底より1m上層) から採取された試水を、フィルターによる前ろ過は行わず、そのまま改変SWM-III培地を用い

て1/10, 1/100, 1/1000の3段階に希釈した。溶解後47℃に保温した0.8%寒天を含む改変SWM-III培地2.5mlに各希釈試水0.1ml及び *S. costatum* の濃縮培養液1mlを各々接種し、すばやく混合した後1.5%寒天を含む改変SWM-III寒天平板培地上に広げ、風乾した。また、宿主のみを混和して作成した重層寒天平板を対照区とした。なお、各希釈試水につき、2枚ずつの重層寒天平板を作成した。以上の操作はクリーンベンチ内で無菌的に行った。シャーレを裏返してインキュベーター内で宿主の前培養と同じ条件下で3週間培養したのち、平板上に生じた溶解斑 (プラーク) を計数し、1ml当たりのプラーク数の平均値を plaque forming units (pfu) として表わした。

珪藻溶解性細菌の単離

プラークが出現した重層寒天平板のうち、主として試水の希釈段階が最も高い平板から、プラーク部分の寒天を白金耳ではぎとり、あらかじめ作成しておいた *S. costatum* NIES-324株のみを軟寒天中に混和した重層寒天平板上に置き、溶解活性の再現性を確認した。再びプラークが生じた場合、そのプラーク部分から珪藻溶解性細菌を白金耳を用いて釣菌し、0.1%カシトンと0.01%酵母エキスを添加した培地に画線して単離を行った。この培地で単離できない場合には、0.1%カシトンと0.05%酵母エキスを添加した改変SWM-III平板培地で単離を試みた。

細菌の簡易同定及び分類学的性状の検討

単離した菌株を、絵面・清水の簡易同定図式 (絵面, 1990) に従って属レベルまで同定した。ただし、寒天表面でのスウォーミング等により滑走運動が認められた株は、寒天分解能がみられない場合にも、*Flavobacterium* 属

ではなく *Cytophaga* 属とした。珪藻溶解性細菌の分類学的性状については、常法 (絵面, 1990; 駒形, 1985) に従って検討を行った。

宿主特異性の検討

(1) 宿主藻

宿主藻には、珪藻 *S. costatum* NIES-324株, *S. costatum*, *Eucampia zodiacus*, *Ditylum brightwellii*, *Chaetoceros didymum*, *Thalassiosira* sp., ラフィド藻 *Chattonella antiqua* NIES-1株及び渦鞭毛藻 *Gymnodinium mikimotoi* G303-AX2株を用いた。このうち *E. zodiacus* は福岡県有明海研究所において単離・無菌化されたものをご厚意により分与して頂いた。

(2) 藻類の前培養

各微細藻類の継代培養及び前培養には、すべて改変SWM-III培地を用いた。継代培養は、P.P.キャップ付きスクリー式18mm試験管に4mlの同培地を入れたものに各微細藻類を接種して行った。前培養は、100mlのP.P.キャップ付き三角フラスコに同培地を50ml入れたものに、継代培養しておいた各微細藻類の培養液をおよそ3ml接種し、珪藻については15℃の、*C. antiqua* 及び *G. mikimotoi* については25℃のインキュベーター中で、 $35\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (12L:12D) の白色光を照射しながら7日間培養した。

(3) 珪藻溶解性細菌の前培養

各単離菌を0.1%カシトン及び0.05%酵母エキスを添加した改変SWM-III培地で対数増殖期まで培養し、その菌液を2mlづつセラムチューブに分注し、-80℃のディープフリーザー内で凍結保存した。試験毎にその1本を流水にさらして速やかに解凍したのち、同培地20mlを300ml容の三角フラスコに入れたもの

に接種し、前々培養とした。対数増殖期後期まで培養したのち、50mlの同培地を300ml容の三角フラスコに入れたものに、660nmにおける濁度が0.01となるように植え継ぎ、前培養とした。いずれも、25℃の恒温室内で旋回培養 (200rpm) を行った。

(4) 溶解活性の確認

P.P.キャップ付きスクリー式18mm試験管に4mlの改変SWM-III培地を入れたものに、前培養した各微細藻類の培養液を0.3ml接種し、15℃もしくは25℃のインキュベーター中で、 $35\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (12L:12D) の白色光を照射しながら2日間培養した。培養2日目に前培養した珪藻溶解性細菌をおよそ 1×10^4 cells/ml の密度となるよう接種し、インキュベーター内でさらに12日間培養した。その間毎日、微細藻類の溶解の有無を肉眼で確認した。肉眼での確認が困難であった場合、培養液を微分干涉顕微鏡 (Nikon 社, OPTIPHOT-2) 下で観察し、微細藻類の細胞の溶解が確認されたとき溶解活性ありと判断した。

結 果

珪藻溶解性微生物の現存量の季節変動

(1) 1992年冬季調査

平成3年度には、定点22及び30において、1992年1月13日から2月25日の間に6回の調査を行った。両定点におけるクロロフィルa量、プランクトン沈殿量及び *S. costatum* 溶解性微生物数の変動を Fig. 3-4 に示す。両定点のいずれにおいても、調査期間中には珪藻のブルームが出現しなかった (切田ら, 1992)。クロロフィルa量及びプランクトン沈殿量はそれぞれ $1\sim 6.6\mu\text{g/l}$ 及び $0.84\sim 9.17\text{ml/m}^3$ と、低いレベルでほとんど変動しなかった。

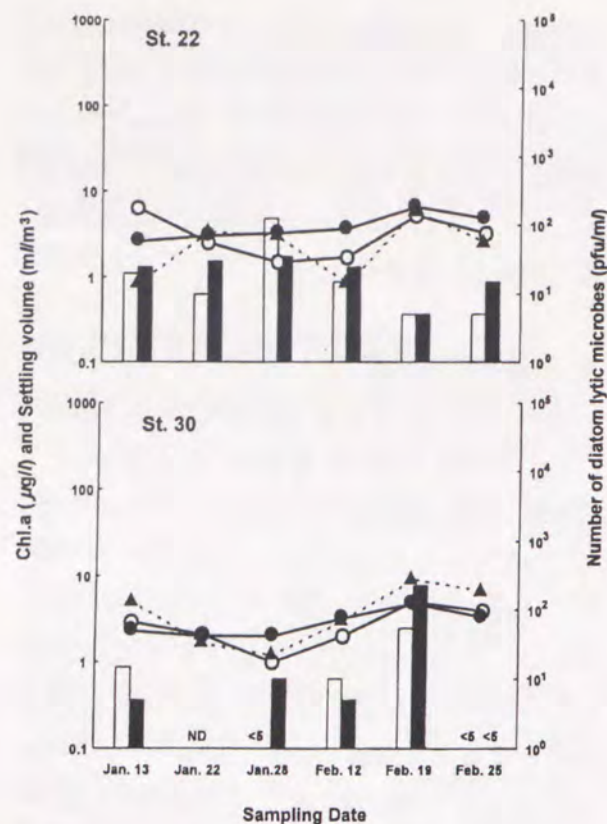


Fig. 3-4 Changes of the abundance of algae and diatom lytic microbes at stations 22 and 30 during sampling period from January to February in 1992.
○, Concentration of chlorophyll-a in surface water;
●, Concentration of chlorophyll-a in bottom water;
▲, Settling volume; □, Number of diatom lytic microbes in surface water; ■, Number of diatom lytic microbes in bottom water; ND, not determined

S. costatum 溶解性微生物数も低いレベルで推移し、最小値が 5pfu/ml 以下、最大値が 230pfu/ml であった。

(2) 1993 年冬季調査

平成 4 年度には、定点 23 及び 30 において、1993 年 1 月 12 日から 2 月 24 日の間に 7 回の調査を行った。両定点におけるクロロフィル a 量、プランクトン沈殿量及び *S. costatum* 溶解性微生物数の変動を Fig. 3-5 に示す。調査期間中の 2 月 4 日～18 日にかけて、*Rhizosolenia delicatula* を主な構成種とする珪藻赤潮が出現

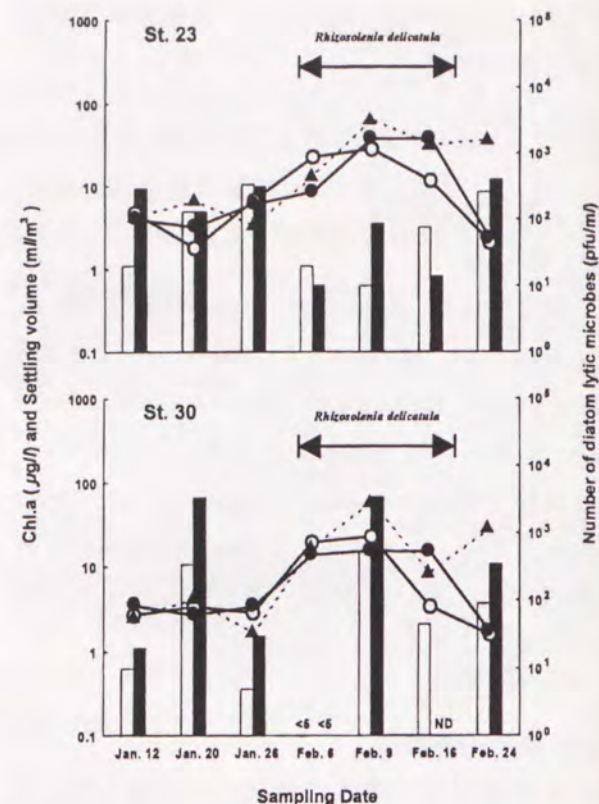


Fig. 3-5 Changes of the abundance of algae and diatom lytic microbes at stations 23 and 30 during sampling period from January to February in 1993.
○, Concentration of chlorophyll-a in surface water;
●, Concentration of chlorophyll-a in bottom water;
▲, Settling volume; □, Number of diatom lytic microbes in surface water; ■, Number of diatom lytic microbes in bottom water; ND, not determined; Arrow indicates the occurrence of red tide by diatoms and its dominant species.

した。クロロフィル a 量は、定点 23 では 1.8～38.0µg/l、定点 30 では 1.6～22.5µg/l の範囲で変動し、共に 2 月 9 日に最大値を示した。プランクトン沈殿量は、定点 23 では 3.3～65.0ml/m³、定点 30 では 1.7～58.3ml/m³ の範囲で変動し、やはり 2 月 9 日に最大値を示した。*S. costatum* 溶解性微生物数は、定点 23 では 10～400pfu/ml、定点 30 では 5 以下～3400pfu/ml の範囲で変動した。定点 30 では珪藻赤潮のピーク時 (2 月 9 日) に *S. costatum* 溶解性微生物数もやや増加したが、定点 23 ではこれとは逆に、赤潮発生時に減少する傾向を示した。

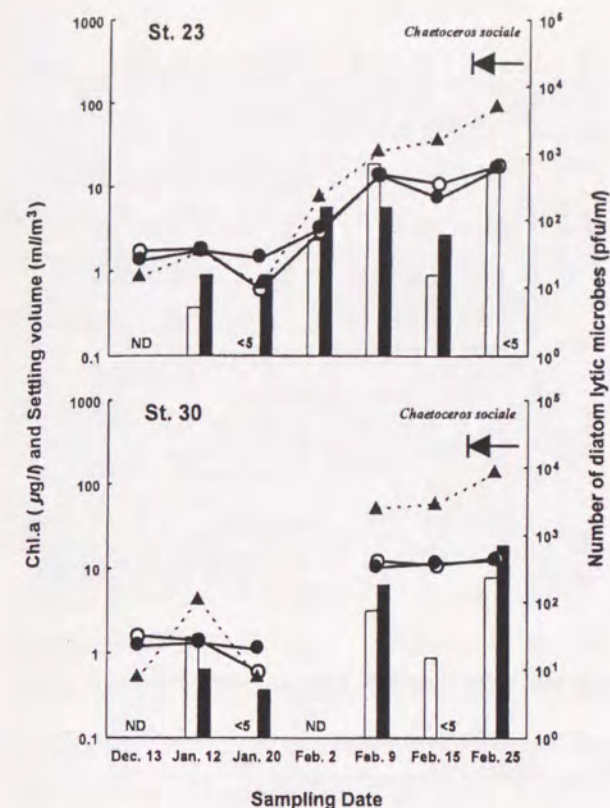


Fig. 3-6 Changes of the abundance of algae and diatom lytic microbes at stations 23 and 30 during sampling period from December, 1993 to February, 1994.
○, Concentration of chlorophyll-a in surface water;
●, Concentration of chlorophyll-a in bottom water;
▲, Settling volume; □, Number of diatom lytic microbes in surface water; ■, Number of diatom lytic microbes in bottom water; ND, not determined; Arrow indicates the occurrence of red tide by diatoms and its dominant species.

(3) 1994 年冬季調査

平成 5 年度には、定点 23 及び 30 において、1993 年 12 月 13 日から 1994 年 2 月 25 日の間に 7 回の調査を行った。両定点におけるクロロフィル a 量、プランクトン沈殿量及び *S. costatum* 溶解性微生物数の変動を Fig. 3-6 に示す。調査最終日の 2 月 25 日から調査終了後の 3 月 10 日にかけて、*Chaetoceros sociale* を主な構成種とする珪藻赤潮が出現した。クロロフィル a 量は、定点 23 では 0.6～18.0µg/l、定点 30 では 0.6～13.4µg/l の範囲で変動したが、両定点のいずれにおいても 2 月に入ると増加し始め、2 月 25 日

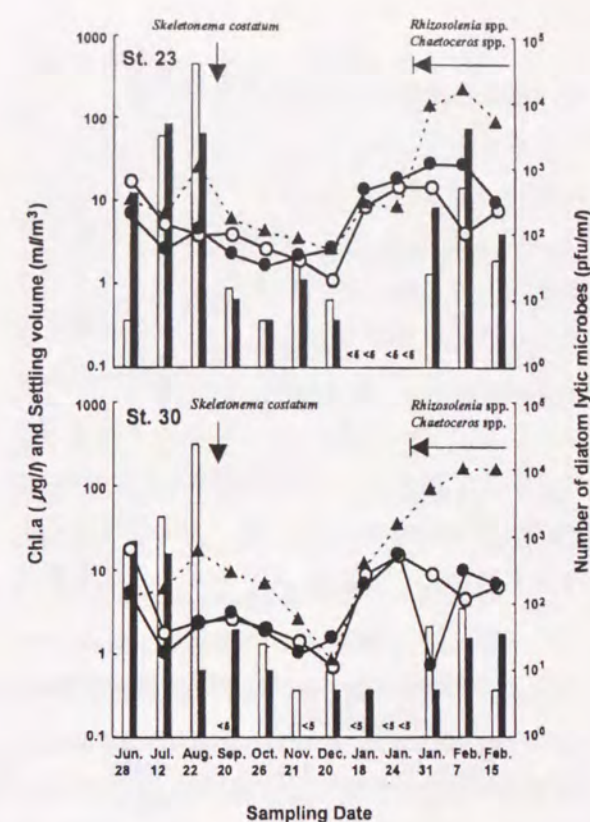


Fig. 3-7 Changes of the abundance of algae and diatom lytic microbes at stations 23 and 30 during sampling period from June, 1994 to February, 1995.
○, Concentration of chlorophyll-a in surface water;
●, Concentration of chlorophyll-a in bottom water;
▲, Settling volume; □, Number of diatom lytic microbes in surface water; ■, Number of diatom lytic microbes in bottom water; Arrow indicates the occurrence of red tide by diatoms and its dominant species.

に最大値となった。プランクトン沈殿量は、定点 23 では 0.7～91.7ml/m³、定点 30 では 0.5～141.7ml/m³ の範囲で変動したが、クロロフィル a 量と同様に 2 月に入ると増加し始め、2 月 25 日に最大値を示した。*S. costatum* 溶解性微生物数は、両定点のいずれにおいても、1 月中は 5 以下～30pfu/ml の低いレベルで推移し、クロロフィル a 量やプランクトン沈殿量と同様に 2 月上旬から増加する傾向を示したが、最大でも 700pfu/ml に留まった。

(4) 1994 年夏季から 1995 年冬季調査

平成 6 年度には、定点 23 及び 30 において、1994 年 6 月 28 日から 1995 年 2 月 15 日の間に 12 回の調査を行った。調査期間中に珪藻赤潮が 2 回出現した。1 回目は 8 月 30 日から 9 月 2 日にかけて赤潮状態となり、その主要構成種は *S. costatum* であったが、この期間内の採水は行っていない。2 回目は 1 月 26 日から 3 月 6 日にかけて出現し、主要構成種は *Rhizosolenia* spp. 及び *Chaetoceros* spp. であった。両定点におけるクロロフィル a 量、プランクトン沈殿量及

び *S. costatum* 溶解性微生物数の変動を Fig. 3-7 に示す。調査日毎のクロロフィル a 量は、定点 23 では 6 月 28 日の 17.9 µg/l から冬場にかけて徐々に減少したが、1 月に入ると再び増加し、2 月 7 日の底層水で 27.8 µg/l の最大値を示した。定点 30 においても、ほぼ同様の変動パターンが見られた。プランクトン沈殿量は、定点 23 では 8 月 22 日に 25.0 ml/m³ の小規模なピークを示した。この時、*S. costatum* が増加しており（定点 23 では 190 cells/ml、定点 30 では 60 cells/ml）、プランクトン現存量の大部分を

Table 3-5 Origin and the result of identification of diatom lytic bacteria isolated from the coastal water of the Ariake Sea.

Strain No.	Year	Date	Station	Depth (m)	Genus*
A11	1992	Jan. 13	30	0	<i>Cytophaga</i>
A12	1992	Jan. 28	22	0	<i>Cytophaga</i>
A13	1992	Jan. 28	22	0	<i>Cytophaga</i>
A14	1992	Jan. 28	22	B-1	<i>Cytophaga</i>
A15	1992	Jan. 28	30	0	<i>Cytophaga</i>
A16	1992	Feb. 12	22	0	<i>Cytophaga</i>
A17	1992	Feb. 12	22	B-1	<i>Cytophaga</i>
A18	1992	Feb. 12	22	B-1	<i>Pseudomonas</i>
A19	1993	Dec. 13	30	B-1	<i>Pseudomonas</i>
A20	1993	Dec. 13	23	0	<i>Cytophaga</i>
A21	1994	Jan. 12	30	0	<i>Flavobacterium</i>
A22	1994	Jan. 12	30	B-1	<i>Pseudomonas</i>
A23	1994	Jan. 12	23	0	<i>Flavobacterium</i>
A25	1994	Jul. 12	30	B-1	<i>Alteromonas</i>
A26	1994	Jul. 12	30	0	<i>Alteromonas</i>
A27	1994	Aug. 22	23	0	<i>Alteromonas</i>
A28	1994	Aug. 22	23	B-1	<i>Alteromonas</i>
A29	1994	Aug. 22	23	0	<i>Alteromonas</i>
A30	1994	Aug. 22	30	0	<i>Alteromonas</i>
A32	1994	Nov. 21	23	B-1	<i>Cytophaga</i>
A33	1994	Nov. 21	23	0	<i>Alteromonas</i>
A34	1994	Nov. 21	23	B-1	<i>Alteromonas</i>
A35	1994	Nov. 21	23	0	<i>Cytophaga</i>
A37	1994	Nov. 21	23	0	<i>Cytophaga</i>
A38	1994	Nov. 21	23	0	<i>Cytophaga</i>
A42	1994	Dec. 20	23	0	<i>Alteromonas</i>
A43	1994	Dec. 20	30	0	<i>Cytophaga</i>
A47	1995	Jan. 18	30	0	<i>Cytophaga</i>
A48	1995	Jan. 24	23	0	<i>Flavobacterium</i>
A49	1995	Jan. 24	23	0	<i>Flavobacterium</i>
A50	1995	Jan. 31	23	0	<i>Cytophaga</i>
A51	1995	Jan. 31	23	0	<i>Cytophaga</i>

*: genus of isolated bacteria was determined according to the scheme by Ezura (1990, in Japanese)

占め、8 月 30 日に海水を着色させるに至った *S. costatum* を主要構成種とする珪藻赤潮の発生初期の状態を示していた（白石, personal communication）。その後プランクトン沈殿量は徐々に減少して 12 月 20 日に 2.5 ml/m³ の最低値を示したが、1 月に入ると再び増加し始め、2 月 7 日に 230.0 ml/m³ の最大値を示した。定点 30 においても、ほぼ同様の変動パターンが見られた。*S. costatum* 溶解性微生物数は、定点 23 及び 30 のいずれにおいても、8 月 22 日に表層水でそれぞれ 37500 及び 24000 pfu/ml の最大値を示した。9 月 20 日から 1 月 24 日にかけては、定点 22 では 5 以下～55 pfu/ml 以下、定点 30 では 5 以下～40 pfu/ml 以下の低いレベルで推移した。1 月 31 日以降は再び増加したものの、定点 23 の表層水では 2 月 7 日に 500 pfu/ml、定点 30 の表層水ではやはり 2 月 7 日に 85 pfu/ml の、それぞれ 8 月 22 日と比べ低いピークを示したに留まった。

珪藻溶解性細菌の単離

重層寒天平板上に形成されたプラークの形状は多様であったが、1994 年 8 月 22 日にのみ、直径 5mm 程度の同一形状のプラークが圧倒的に優占していた。その他の調査日には、中央部に細菌のコロニーが見られるタイプと、中央部に全く細菌のコロニーが見られないタイプの 2 通りのプラークが見られたが、その大きさは様々（直径 2mm～10mm 程度）であり、単一形状のプラークが際立って優占することはいなかった。

できるだけ希釈段階の高い重層寒天平板上に生じたプラークから *S. costatum* 溶解性微生物の単離を試みた結果、1992 年冬季には 8 株、1994 年冬季（1993 年 12 月を含む）には 5 株、

1994 年夏季から 1995 年冬季には 19 株、計 32 株の *S. costatum* 溶解性細菌を単離した。アメーバや糸状菌など、細菌以外の溶解性微生物は単離されなかった。なお、1993 年冬季には単離を行っていない。これら単離菌の由来及び簡易同定の結果をまとめて Table 3-5 に示す。*S. costatum* 溶解性細菌は、いずれの定点からでも、また表層水と底層水のどちらからも単離された。季節による優占種の違いを見ると、夏季（1994 年 7 月～8 月）に単離された 6 株の細菌は全て *Alteromonas* 属であった。秋季（11 月）には、*Cytophaga* 属細菌が 4 株及び *Alteromonas* 属細菌が 2 株単離され、冬季（12 月～2 月）には、*Cytophaga* 属細菌が 12 株と多く単離されたほか、*Flavobacterium* 属細菌 4 株、*Pseudomonas* 属細菌 3 株及び *Alteromonas* 属細菌 1 株がそれぞれ単離された。

単離した珪藻溶解性細菌の分類学的性状

単離した *S. costatum* 溶解性細菌 32 株のうち、1994 年の夏季に圧倒的に優占していた *Alteromonas* 属細菌及び秋季から冬季に最も多く単離された *Cytophaga* 属細菌について、若干の分類学的性状を調べた結果を、Table 3-6 及び Table 3-7 に示す。

1994 年 7 月及び 8 月に採取した試水から単離された 6 株の *Alteromonas* 属細菌については、7 月 12 日に採取した試水から単離された A25 株と A26 株は黄色の菌体色素を持ち 8 月 22 日に採取した試水から単離された A27～30 株の 4 株は菌体色素を持たない、また A27 と A29 株が好塩型菌で残りの 4 株は海洋型菌であるという違いは見られたものの、その他の性状は極めて類似していた（Table 3-6）。

Cytophaga 属細菌については、分類学的性状にかなりの違いが見られた。1992 年 1 月及び 2 月に採取した試水から単離された 7 株 (A11~

A17) のうち、A11, A14, A15 の 3 株及び A13, A17 の 2 株は、それぞれ同じ性状を示した。A12 株は A13 株及び A17 株に近い性状を示し

Table 3-6 Some taxonomical characteristics of diatom lytic *Alteromonas* spp. isolated from the Ariake Sea in the summer of 1994.

Characteristic	A25	A26	A27	A28	A29	A30
Gram-stain	-	-	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+	+	+
Shape	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod
Flagellum	Polar	Polar	Polar	Polar	Polar	Polar
Colony color	Yellow	Yellow	-	-	-	-
Diffusible pigment	-	-	-	-	-	-
OF-test	Oxidative	Oxidative	Oxidative	Oxidative	Oxidative	Oxidative
Marine or terrestrial	Marine	Marine	Halophilic	Marine	Halophilic	Marine
Degradation of agar	-	-	-	-	-	-
Dnase	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-
Oxidase	+	+	+	+	+	+

Table 3-7 Some taxonomical characteristics of diatom lytic *Cytophaga* spp. isolated from the Ariake Sea.

Characteristic	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A20
Gram-stain	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility	Gliding	Gliding	Gliding	Gliding	Gliding	Gliding	Gliding	Gliding
Shape	Long rod	Long rod	Long rod	Long rod	Long rod	Long rod	Long rod	Long rod
Flagellum	-	-	-	-	-	-	-	-
Colony color	Salmon	Salmon	Salmon	Salmon	Salmon	Orange	Salmon	Salmon
Diffusible pigment	-	-	Brown	-	-	-	Brown	-
OF-test	-	Oxidative	Oxidative	-	-	Oxidative	Oxidative	-
Marine or terrestrial	Marine	Marine	Marine	Marine	Marine	Terrestrial	Marine	Marine
Degradation of agar	-	+	+	-	-	-	+	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-

Characteristic	A32	A35	A37	A38	A43	A47	A50	A51
Gram-stain	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility	Gliding	Gliding	Gliding	Gliding	Gliding	Gliding	Gliding	Gliding
Shape	Long rod	Long rod	Long rod	Long rod	Long rod	Long rod	Long rod	Long rod
Flagellum	-	-	-	-	-	-	-	-
Colony color	Salmon	Salmon	Orange	Orange	Orange	Yellow	Yellow	Yellow
Diffusible pigment	-	-	-	-	-	-	-	-
OF-test	Oxidative	Oxidative	Oxidative	Oxidative	Oxidative	Oxidative	Oxidative	Oxidative
Marine or terrestrial	Marine	Marine	Marine	Marine	Marine	Marine	Marine	Marine
Degradation of agar	+	+	-	+	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	-	-	-	-	-	-

たが、茶色の菌体外色素を産生しない点で異なっていた。A16 株は塩分を含まない培地でも増殖できる点で、他のいずれの菌株とも異なっていた。1993 年 12 月 13 日に採取した試水から単離された A20 株は、A11 株などと同じ性状を示した。1994 年 11 月及び 12 月に採取した試水から単離された 5 株 (A32, A35, A37, A38 及び A43 株) のうち、A32, A35 の 2 株及び A37, A43 の 2 株はそれぞれ同じ性状を示した。A38 株は A32 や A35 株に近い性状を示したがオキシダーゼ活性を持たない点で異なっていた。1995 年 1 月 18 日と 31 日に採取した試水から単離された 3 株 (A47, A50 及び A51 株) は同じ性状を示し、薄い黄色の菌体色素を持つ点でそれまでに単離されたいずれの菌株とも異なっていた (Table 3-7)。

単離した珪藻溶解性細菌の宿主特異性

分類学的性状を調べた 6 株の *Alteromonas* 属細菌及び 16 株の *Cytophaga* 属細菌について、5 種 6 株の珪藻、ラフィド藻 *C. antiqua* 及び渦鞭毛藻 *G. mikimotoi* に対する溶解活性を調べた結果を、それぞれ Table 3-8 及び 3-9 に示す。*Alteromonas* 属細菌については、A25 株を除く 5 株が同じ宿主域を示し、単離の際に宿主に用

いた *S. costatum* 2 株、*S. costatum* と同じ *Coscinodiscineae* 亜目 *Coscinodiscaceae* 科に属する *Thalassiosira* sp., *Biddulphiaceae* 亜目 *Biddulphiaceae* 科の珪藻 *E. zodiacs* 及びラフィド藻 *C. antiqua* を溶解したが、*Biddulphiaceae* 亜目 *Lithodesmiaceae* 科の珪藻 *D. brightwellii* 及び渦鞭毛藻 *G. mikimotoi* を溶解できなかった。なお、A25 株は *D. brightwellii* を溶解した点でのみ異なっていた (Table 3-8)。*Cytophaga* 属細菌については、16 株全てが宿主に用いた *S. costatum* を含む *Coscinodiscineae* 亜目 *Coscinodiscaceae* 科の珪藻を良く溶解し、*G. mikimotoi* を溶解できない点で共通していたが、*Biddulphiaceae* 亜目の珪藻やラフィド藻 *C. antiqua* に対しては、これらを溶解できる菌株とできない菌株が存在するなど、それらの宿主域は様々であった (Table 3-9)。なお、微細藻類の細胞自体はダメージを受けず、その増殖のみが抑制されるという、増殖阻害活性の存在を明確に示すような結果は観察されなかった。また、*C. didymum* は経代培養中に死滅したため、*Alteromonas* 属細菌 6 株及び *Cytophaga* 属細菌 8 株については同珪藻に対する溶解活性の検討を行うことができなかった。

Table 3-8 Host specificity of diatom lytic *Alteromonas* spp. isolated from the Ariake Sea in the summer of 1994.

Host algae	A25	A26	A27	A28	A29	A30
<i>Skeletonema costatum</i> NIES-324	+	+	+	+	+	+
<i>S. costatum</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Thalassiosira</i> sp.	+	+	+	+	+	+
<i>Eucampia zodiacs</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Chaetoceros didymum</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Ditylum brightwellii</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Chattonella antiqua</i> NIES-1	+	+	+	+	+	+
<i>Gymnodinium mikimotoi</i> G303-AX2	-	-	-	-	-	-

考 察

近年、沿岸海域において、赤潮藻類を溶解、殺藻もしくは増殖抑制する能力を持つ微生物の現存量をバイオアッセイ法によって測定する試みがさかんに行われるようになり、このような微生物が沿岸海域に広く分布すること、またそれらの現存量は赤潮藻類の消長に関連して変動することなどが明らかになってきた。今井（1995）は、北部広島湾において発生する渦鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* の赤潮発生時及びその前後に *H. akashiwo* とラフィド藻 *C. antiqua* をそれぞれ宿主に用いた MPN 法によって殺藻性細菌の計数を行い、*H. akashiwo* に対する殺藻性細菌が *H. akashiwo* 赤潮の発生に伴って増加し、赤潮の消滅後もしばらく高密度 (10^2 cells/ml) を維持したのち減少するのに対し、現場で赤潮とならなかった *C. antiqua* に対する殺藻性細菌は全期間を通じて低密度 ($10^1 \sim 10^1$ cells/ml) で推移することを見出した。

Yoshinaga ら（1995b）は、夏季に渦鞭毛藻 *G. mikimotoi* の赤潮が発生する和歌山県田辺湾において、*G. mikimotoi* 増殖阻害細菌 (*G. mikimotoi*'s growth inhibiting bacteria; Gm-GIB) の MPN 法による計数を試み、Gm-GIB は通常海水中に 10^3 cells/ml 程度存在するが、*G. mikimotoi* 赤潮の発生時には 1~2 桁ほど減少し、赤潮が消滅するのに伴って再び増加することを示した。深見と西島（1994）は、高知県浦ノ内湾において *G. mikimotoi* 及び *S. costatum* の細胞密度と MPN 法によって求めたそれらに対する増殖阻害細菌数の変動とを比較し、現場で微細藻類の密度が増加する時期にはその藻類に対する増殖阻害細菌数が減少し、逆に微細藻類の密度が減少する時期にはその藻類に対する増殖阻害細菌数が最大 10^3 cells/ml 程度まで増加することを示した。これらの調査結果から、赤潮藻類の現存量の変動とその藻類に対する殺藻性微生物の現存量のそれとは正の相関を、赤潮藻類の現存量の

変動とその藻類に対する増殖阻害細菌の現存量のそれとは負の相関を、それぞれ示す傾向が窺える。しかしながら、珪藻赤潮に対する溶解性・殺藻性微生物や増殖阻害細菌の現存量に関する知見や、その変動と珪藻赤潮の消長との関連性に関する知見は、これまでに得られていない。

本研究では、有明海において冬季にしばしば赤潮を形成し、ノリ養殖に被害を与えている珪藻 *S. costatum* を宿主に選び、藍藻溶解性細菌の検出に実績のある重層寒天平板法を用いたバイオアッセイ法によって、珪藻溶解性微生物の計数を試みた。1992 年から 1995 年にかけての調査期間中に、珪藻赤潮が 4 回発生したが、そのうち重層寒天平板法で用いた宿主と同種の *S. costatum* を主要構成種とする赤潮が 1 回発生し、宿主とは別種の *R. delicatula*, *C. sociale*, 及び *Rhizosolenia* spp. と *Chaetoceros* spp. をそれぞれ主要構成種とする赤潮が各 1 回ずつ発生した。*S. costatum* 溶解性微生物数は、赤潮の非発生時には春季 (10^3 pfu/ml 程度) を除いて 5 以下 $\sim 10^1$ pfu/ml の低い値で推移した。1994 年 8 月 30 日から 9 月 2 日に *S. costatum* を主要構成種とする赤潮が出現したが、その発生初期段階に相当し、*S. costatum* がすでに植物プランクトンの優占種となっていた 8 月 22 日には、*S. costatum* 溶解性微生物数が顕著に増加しており、 10^4 pfu/ml の密度に達していた。この 10^4 pfu/ml という高い値は、琵琶湖及び諏訪湖において藍藻のブルームの最盛期に得られた藍藻溶解性微生物の現存量 (Figs. 2-4, 2-5 and 2-7) に匹敵する。今井（1995）は、北部広島湾において *H. akashiwo* の赤潮崩壊時に MPN 法により 10^2 cells/ml という殺藻性細菌数を得ているが、吉永ら（1995a）は、同じ時期に寒天平板培養から単離された従属栄養細菌全てについて *H. akashiwo* 殺藻活性を調べた結

果、 $10^4 \sim 10^5$ cells/ml と MPN 法より 2 から 3 桁高い殺藻性細菌数を得ており、MPN 法によって得られた値が実際よりかなり過小評価となっていることを指摘し、その原因として MPN の各試験管中には殺藻性細菌のほか藻類の増殖を促進する細菌や殺藻性細菌の増殖を阻止する細菌などが混在している可能性を挙げている。微細藻類のブルーム発生時における溶解性・殺藻性微生物数は、湖沼と同様に沿岸海域においても、 10^4 cells or pfu/ml 以上の密度に達するのではないかと考えられる。一方、珪藻赤潮の主要形成種が *Rhizosolenia* 属や *Chaetoceros* 属であった場合には、*S. costatum* 溶解性微生物数はやや増加したに留まり、赤潮のピーク時においても 10^2 pfu/ml と、*S. costatum* を主要構成種とする赤潮の発生初期段階に得られた値よりも 2 桁低い値に留まった。この結果は、有明海沿岸海域に *S. costatum* の赤潮に関連した生態を持つ珪藻溶解性微生物群が存在している可能性を示唆している。

重層寒天平板上に生じたブランクから単離した *S. costatum* 溶解性微生物はいずれも細菌であった。これらは、*Cytophaga* 属、*Flavobacterium* 属、*Alteromonas* 属及び *Pseudomonas* 属のいずれかに簡易同定された (Table. 3-5)。芝ら (personal communication) はこれらの単離菌の 16SrRNA 遺伝子 (16SrDNA) の制限酵素 *Hae* III による切断断片の RFLP (制限酵素処理断片長多型) 解析を行い、簡易同定により *Alteromonas* 属とされた 9 株の細菌は RFLP パターンにより 3 グループに分けられ、1994 年 7 月及び 8 月に単離された 6 株 (A25~A30 株)、1994 年 11 月に単離された 2 株 (A33 及び A34 株) は、それぞれ同一の RFLP パターンを示し 1 つのクラスターを形成することを明らかにした。また簡易同定により *Cytophaga* 属とされた 16 株の細菌は

Table 3-9 Host specificity of diatom lytic *Cytophaga* spp. isolated from the Ariake Sea.

Host algae	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A20
<i>Skeletonema costatum</i> NIES-324	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. costatum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Thalassiosira</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Eucampia zodiacs</i>	+	-	-	+	+	-	-	+
<i>Chaetoceros didymum</i>	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>Ditylum brightwellii</i>	+	-	-	+	+	-	+	+
<i>Chattonella antiqua</i> NIES-1	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>Gymnodinium mikimotoi</i> G303-AX2	-	-	-	-	-	-	-	-

Host algae	A32	A35	A37	A38	A43	A47	A50	A51
<i>Skeletonema costatum</i> NIES-324	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. costatum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Thalassiosira</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Eucampia zodiacs</i>	-	-	+	-	-	+	-	+
<i>Chaetoceros didymum</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Ditylum brightwellii</i>	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>Chattonella antiqua</i> NIES-1	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Gymnodinium mikimotoi</i> G303-AX2	-	-	-	-	-	-	-	-

ND: not determined

RFLP パターンにより 7 グループに分けられ、1992 年 1 月に単離した 5 株のうち A13 株を除く 4 株 (A11, A12, A14 及び A15 株), 1992 年 1 月と 2 月に単離された 2 株 (A13 株と A16 株), 1994 年 11 月に単離した 4 株 (A32, A35, A37 及び A38 株) 及び 1995 年 1 月に単離した 3 株 (A47, A50 及び A51 株) は、それぞれ同一の RFLP パターンを示し 1 つのクラスターを形成することを明らかにした。この結果は、簡易同定により同属とされた *S. costatum* 溶解性細菌間においても、単離した時期によって優占種の交代が起こっている可能性を示唆している。有明海沿岸海域には、極めて多様な *S. costatum* 溶解性細菌が存在しているものと考えられる。

吉永ら (1995b) は、広島湾において *H. akashiwo* 赤潮の発生時及びその前後に、MPN 法によって *H. akashiwo* に対する殺藻性細菌の優占種を単離し、それらを 16SrRNA 遺伝子 (16SrDNA) の RFLP (制限酵素処理断片長多型) 解析によってグループ分けした結果、海水中にはかなり多様な *H. akashiwo* 殺藻性細菌群が存在していたが、*H. akashiwo* 赤潮の消滅時には、特定の殺藻性細菌群が優占していたと述べている。本調査においても *S. costatum* を主要構成種とする珪藻赤潮の発生初期段階に当たる 1994 年 8 月 22 日には、同一形状のプラークのみが圧倒的に優占していた。またこれらのプラークから単離された 4 株の *Alteromonas* 属細菌は、分類学的性状が調べた範囲で同一である (Table 3-6) のみならず、これらの 16SrDNA の制限酵素 *Hae* III による切断断片の RFLP パターンが同一であった (芝ら, personal communication)。この結果は、*S. costatum* を主要構成種とする赤潮の発生初期段階に当たる 8 月 22 日には、分類学的に近縁な *Alteromonas* 属細菌群が 10^4 pfu/ml の高密度

まで増加し、*S. costatum* 溶解性細菌群の中で優占していたことを意味する。一方、*S. costatum* 赤潮の非発生時に当たる秋季から冬季にかけては *Cytophaga* 属細菌が多く単離されたものの、極端に優占することはなく、多様な *S. costatum* 溶解性細菌が 10^2 pfu/ml 以下の低密度で存在していた。*S. costatum* を主要構成種とする赤潮の発生初期段階には、有明海沿岸海水中に存在している多様な *S. costatum* 溶解性細菌群の中から、何らかの理由により特定の *Alteromonas* 細菌群のみが選択的に増加して優占種となっていた可能性が考えられる。

珪藻赤潮発生時に選択的に増加してくる細菌群が、どのような条件によって決まっているのかについては、まだ得られている情報が少なく、現時点では明らかではない。本調査において *S. costatum* を主要構成種とする赤潮の発生初期段階に優占していた *Alteromonas* 属細菌と非発生時に多く単離された *Cytophaga* 属細菌では、いずれも単離の際に宿主に用いた *S. costatum* を含む *Coscinodiscineae* 亜目 *Coscinodiscaceae* 科の珪藻に対してのみならず、他亜目の珪藻やラフィド藻 *C. antiqua* を溶解するなど、琵琶湖や諏訪湖から単離された藍藻溶解性細菌と比較すると宿主特異性が低く、また両者の宿主域に明確な違いは見られなかった (Tables 3-8 and 3-9)。従って、優占する細菌群が宿主特異性の高さや違いによって決まっているとは考えにくい。宿主に対する溶解活性の強さや、宿主が増殖に伴って細胞外に放出する有機物 (EOM) を基質としたときの増殖速度の速さなど宿主との相互関係に関わる要因や、周囲の環境要因など、様々な条件が優占種の選択に影響を及ぼしているのではないかと推察される。今後、これらの点についてさらに検討を進めていかねばならないが、そのためには、有明海における主要

な *S. costatum* 溶解性細菌と考えられる *Alteromonas* 属細菌と *Cytophaga* 属細菌の現場における挙動をより詳細に検討する必要がある。そのためには、両者を別々に検出できる方法、たとえば蛍光抗体や DNA プローブを用いた検出法の早急な開発が望まれる。また、有明海において赤潮を形成する *S. costatum* 以外の珪藻に対する溶解性微生物群についても調査を行い、*S. costatum* 溶解性細菌群との違いや、これらの相互関係についても検討する必要があるだろう。

第3節 単離した珪藻溶解性細菌の示す珪藻溶解の作用機作

緒 言

細菌が赤潮藻類を溶解もしくは殺藻する作用機作については、細菌が宿主に接触して直接攻撃を行う場合 (Imai *et al.*, 1993; 坂田, 1994; Imai *et al.*, 1995) と、宿主との接触を必要とせず、細菌の代謝産物によって溶解・殺藻が起こる場合 (竹内ら, 1992; 深見と西島, 1994; Yoshinaga *et al.*, 1995; Imai *et al.*, 1995; 坂田, 1995) の 2 通りが観察されている。しかしながら、これらの作用機作については、各海域から単離された代表的な菌株 1 株についてのみ検討が行われている場合がほとんどであり、同一海域から得られ、簡易同定により同じ属に分類された複数の単離株について検討が行われた例は極めて少ない (Imai *et al.*, 1995) ため、報告されている機作が、それぞれの海域に生息する溶解性・殺藻性細菌の示す一般的な作用機作であるかどうかは、明らかではない。

本節では、多くの単離株が得られており、有明海沿岸海域における主要な *S. costatum* 溶

解性細菌であると考えられる *Alteromonas* 属細菌と *Cytophaga* 属細菌について、*S. costatum* NIES-324 株に対する溶解の作用機作を調べると共に、同属の細菌間で作用機作に多様性が見られるかどうかについても検討を行った。

材料及び方法

珪藻溶解性細菌及びその前培養

S. costatum NIES-324 株を宿主とした重層寒天平板法によって単離された珪藻溶解性細菌のうち *Cytophaga* 属と簡易同定された 16 株に従属栄養細菌群から単離された *Cytophaga* sp. A5Y 株を加えた 17 株、及び 1994 年夏季 (7 月と 8 月) に単離され、*Alteromonas* 属と簡易同定された 6 株を、それぞれ試験に用いた。これらを 0.1% カシトン及び 0.05% 酵母エキスを添加した改変 SWM-III 培地で対数増殖期まで培養し、その菌液を 2ml づつセラムチューブに分注し、 -80°C のディープフリーザー内で凍結保存した。試験毎にその 1 本を流水にさらして速やかに解凍したのち、同培地 20ml を 300ml 容の三角フラスコに入れたものに接種し、前々培養とした。対数増殖期後期まで培養したのち、50ml の同培地を 300ml 容の三角フラスコに入れたものに、660nm における濁度が 0.01 となるように植え継ぎ、前培養とした。いずれも、 25°C の恒温室内で旋回培養 (200rpm) を行った。

宿主珪藻及びその前培養

宿主藻として無菌培養の珪藻 *S. costatum* NIES-324 株を用いた。50ml の改変 SWM-III 培地を入れた 100ml 容の三角フラスコに *S. costatum* を接種した。これを 15°C のインキュベーター (日本医科器械製, LH-200-RD) 中で $35\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

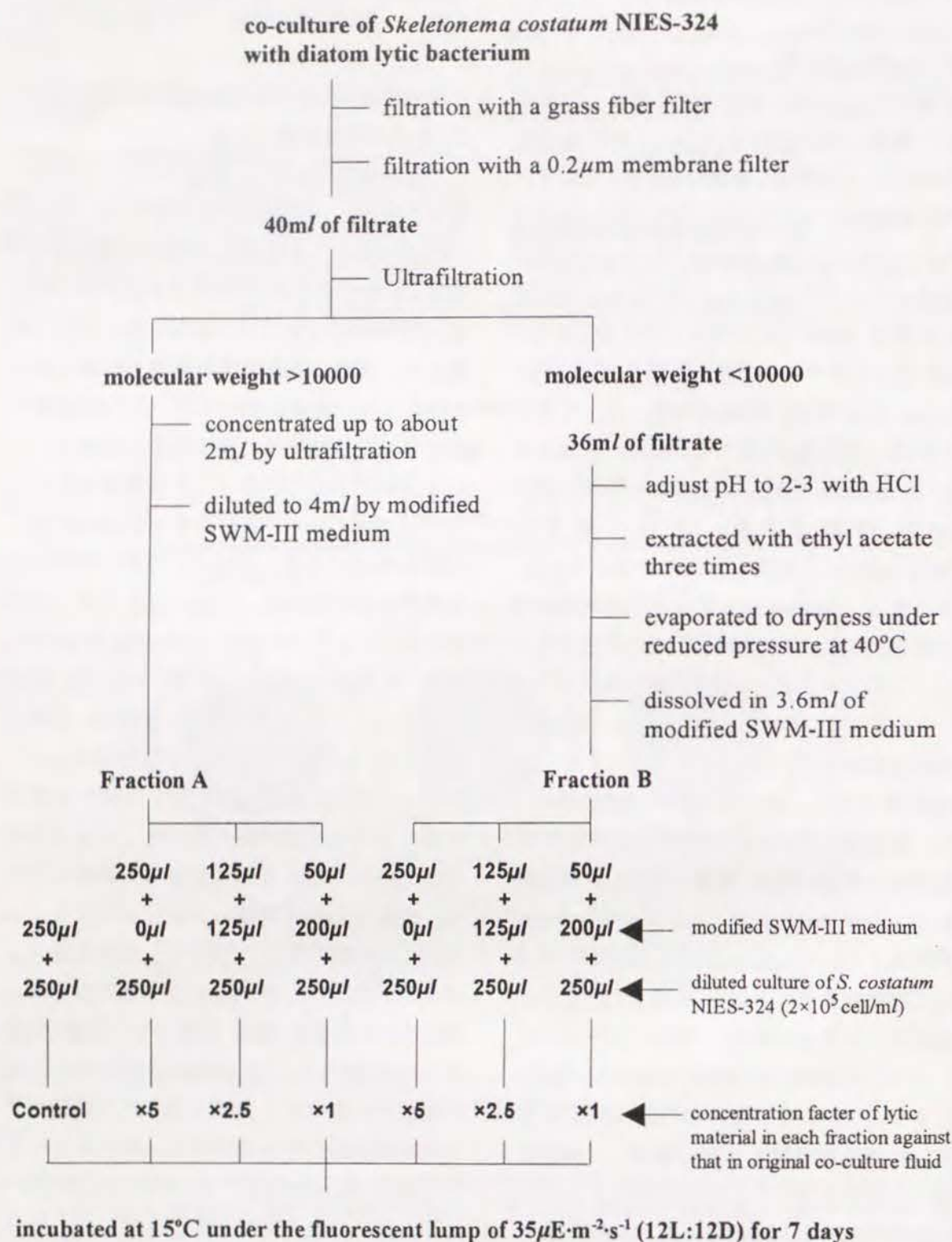


Fig. 3-9 Procedure of the fractionation of lytic material in co-culture fluid.

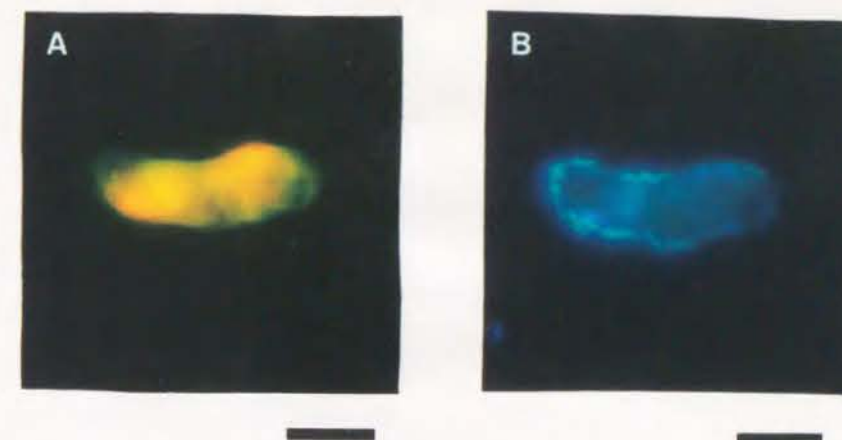


Fig. 3-10 Epifluorescence micrographs of *Alteromonas* sp. A28 attacking *Skeletonema costatum* NIES-324. Bar=10 μm .
A: Partially lysed cells of *S. costatum* observed under blue-light excitation. Note that auto-fluorescence of chloroplasts is weak.
B: The same diatom cells as in A and attached bacterial cells on the surface of them observed under UV-light excitation.

(2) 珪藻溶解活性の確認

対数増殖期の *S. costatum* NIES-324 株の培養液を改変 SWM-III 培地で希釈し、細胞密度を 2×10^5 cells/ml に調整した。これをガス滅菌済の 48 ウェルマルチプレート (14 個のウェルに、0.25ml ずつ分注した。対照区としては、改変 SWM-III 培地を 0.25ml 加え、合計の液量を 0.5ml とした。分子量 1 万以上の画分 (Fraction A) では、*S. costatum* の希釈培養液に、(1) の操作によって元の二者培養液に対して 10 倍濃度に濃縮した画分を 0.25ml (5 倍濃度区)、0.125ml (2.5 倍濃度区) 及び 0.05ml (1 倍濃度区) ずつそれぞれ加え、さらに改変 SWM-III 培地を加えて合計の液量を 0.5ml とした。分子量 1 万以上かつ酢酸エチル可溶性の画分 (Fraction B) では、(1) の操作によって元の二者培養液に対して 10 倍濃度に濃縮した画分を 0.25ml (5 倍濃度区)、0.125ml (2.5 倍濃度区) 及び 0.05ml (1 倍濃度区) ずつそれぞれ加え、さらに改変 SWM-III 培地を加えて合計の液量を 0.5ml とした。対照区及びいずれの濃度区においても、1 試料につき 2 個のウェルを使用し、

2 本立てとした。このマルチプレートを 15°C、 $35 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (12L:12D) のインキュベーター (日本医科器械製、LH-200-RD) に入れ、培養 7 日目に、*S. costatum* の細胞密度を微分干渉顕微鏡下で直接計数した。

結果

珪藻の溶解過程の特徴

6 株の *Alteromonas* 属細菌をそれぞれ *S. costatum* NIES-324 株と二者培養し、珪藻の溶解の様子を顕微鏡観察したところ、細菌が鞭毛運動によって遊泳し、健康な *S. costatum* の殻の外側に付着したり離れたりする様子が観察された。*S. costatum* の溶解が始まると、細菌が多数付着した *S. costatum* の細胞 (Fig. 3-10) が観察された。これら細菌が付着した細胞の内容物は徐々に溶解されてゆき、溶解終了時には、ほぼ全ての *S. costatum* 細胞の内容物がごく一部を残して消失していた。

17 株の *Cytophaga* 属細菌については、次の 2 通りの溶解過程が観察された。一方は、*S.*



costatum の溶解が始まると、二者培養液中にプロトプラストが多数出現してくるというものである。また、*S. costatum* の上殻と下殻の継ぎ目がはずれ、そこからプロトプラストが膨出したことを示すような例もしばしば観察された (Fig. 3-11)。さらに培養を続けると、プロトプラストも完全に溶解・消失した。もう一方は、*Alteromonas* 属細菌で見られた過程と同様に *S. costatum* の殻はそのまま細胞内容物がごく一部を残して消失する (Fig. 3-12) というものである。17 株中、A5Y, A11, A13, A14 及び A20 の 5 株については前者の過程のみが、A15, A16, A37, A43, A47, A50 及び A51 の 7 株については後者の過程のみが、A12, A17, A32, A35 及び A38 の 5 株については両方の溶解過程が同時に観察された。なお、これらの *Cytophaga* 属細菌については、単独の細胞がその先端部分で *S. costatum* の細胞やプロトプラストに付着している場合はしばしば観察されたものの、琵琶湖から単離された *Lysobacter* sp. LB-1 株で見られたような顕著な塊 (Fig. 2-21) は観察されなかった。

珪藻細胞への接触の必要性

Alteromonas 属細菌 6 株について、細菌が珪藻細胞に接触することがその溶解を引き起こすための必要条件なのかどうかを調べた結果を Fig. 3-13 に示す。細菌と *S. costatum* の双方をミリセルの内側 (区画 B) に接種した陽性対照区においては、珪藻は、いずれの細菌を接種した場合にも細菌接種後 8 日目までに溶解され、細菌の細胞密度は $10^7 \sim 10^8$ cells/ml に達していた。ミリセルの外側 (区画 F) に細菌を接種した試験区においても、細菌接種後 8 日目までにミリセルの内側 (区画 C) の珪藻の溶解が認められ、ミリセルの外側 (区画 F) の細菌は 10^7 cells/ml の細胞密度まで増殖していた。

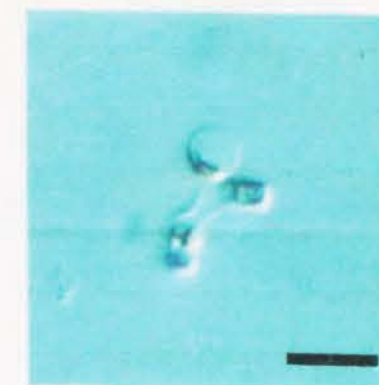


Fig. 3-11 Microscopic observation of the protruded protoplast of *Skeletonema costatum* NIES-324 lysed by *Cytophaga* sp. A5Y. Bar=20µm.

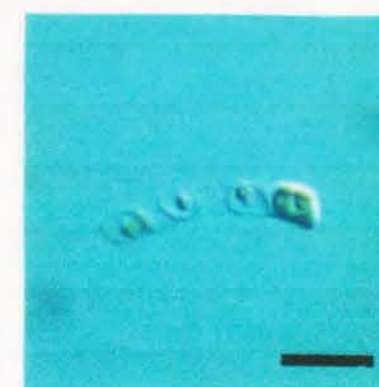


Fig. 3-12 Microscopic observation of the vacant cells of *Skeletonema costatum* NIES-324 lysed by *Cytophaga* sp. A15. Bar=20µm.

なお、区画 E に細菌接種後 8 日目においても細菌の侵入が認められなかったことから、*Alteromonas* 属細菌 6 株は、いずれも *S. costatum* の細胞に接触することなくこれを溶解できることが確かめられた。

なお、*Cytophaga* 属細菌については、珪藻が溶解される以前に細菌がメンブレンフィルターを通過して隣の区画に侵入してしまうために、結果が得られなかった。

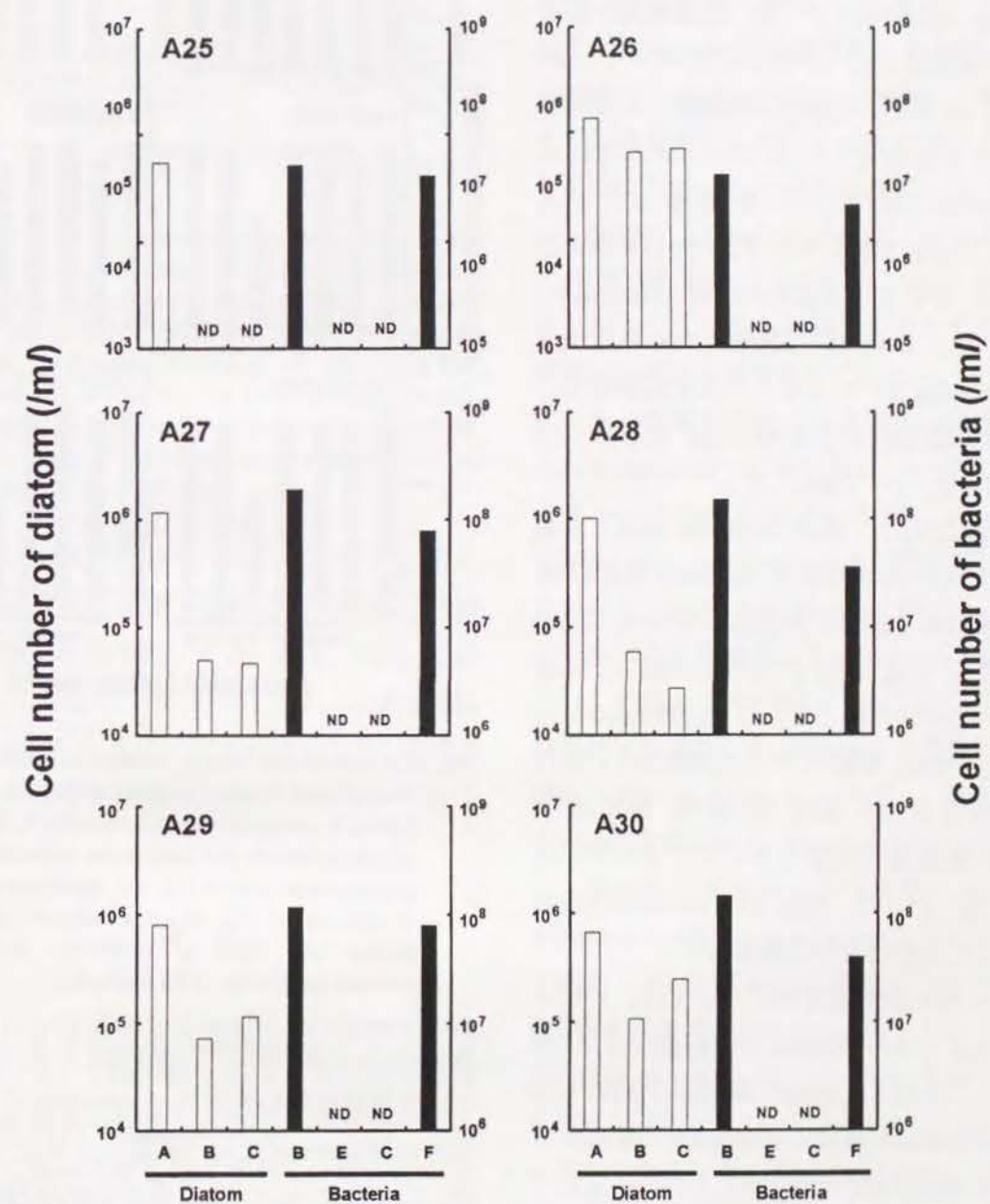


Fig. 3-13 Lysis of *Skeletonema costatum* NIES-324 in MILLICELL (compartment C) separated by membrane filter (pore size, $0.4\mu\text{m}$) from the outside (compartment F), in which diatom lytic *Alteromonas* sp. was inoculated. White bar indicates the cell number of *S. costatum* in MILLICELL (compartments A, B and C) after 18 days of incubation (after 8 days from the inoculation of diatom lytic *Alteromonas* sp. to compartments B and F). Black bar indicates the cell number of *Alteromonas* sp. in inside (compartments B and C) and outside (compartments E and F) of MILLICELL after 8 days from the inoculation. See Fig. 3-8 about the scheme of this experiment. ND; not detected.

二者培養液に含まれる珪藻溶解活性

Alteromonas 属細菌については、1994 年夏季に単離された 6 株のうち A25 と A27 の 2 株を、*Cytophaga* 属細菌については、重層寒天平板法によって単離された 16 株のうち A50 と A51 株を除く 14 株に、従属栄養細菌群から単離された A5Y 株を加えた計 15 株を、それぞれ *S. costatum* NIES-324 株と二者培養した。*S. costatum* が溶解された時点で、それらの培養液を集め、分子量 1 万以上の画分 (Fraction A) 及び分子量 1 万未満かつ酢酸エチル可溶性の画分 (Fraction B) に分けてそれぞれ濃縮し、それぞれの画分に珪藻溶解活性が含まれているかどうかについて検討した。

まず対照として、改変 SWM-III 培地と培養 4, 8, 12 及び 16 日目の *S. costatum* NIES-324 株の無菌培養液をそれぞれ二者培養液と同様の手順 (Fig. 3-9) に従って分画し、珪藻溶解活性の有無を調べたところ、Fraction B の 5 倍濃度区では、培養 7 日目に生残していた珪藻細胞の密度が、改変 SWM-III 培地に *S. costatum* を接種した場合と比べて少なかった (Fig. 3-14)。また、同濃度区では細胞内容物が消失した珪藻細胞が観察された。

Alteromonas 属細菌 2 株については、いずれも二者培養液の Fraction B の各濃度区で、培養 7 日目に生残していた珪藻細胞の密度が、*S. costatum* の無菌培養液の Fraction B の各濃度区と比べて有意に少なかった (Fig. 3-15)。また両細菌の二者培養液の Fraction B の 5 倍濃度区では、生菌を作用させた場合と同様に、ほぼ全ての *S. costatum* の細胞の内容物が消失していた。

Cytophaga 属 15 株について同様の検討を行った結果を Fig. 3-16 に示す。A12, A35, A20 及び A38 の 4 株については、二者培養液の

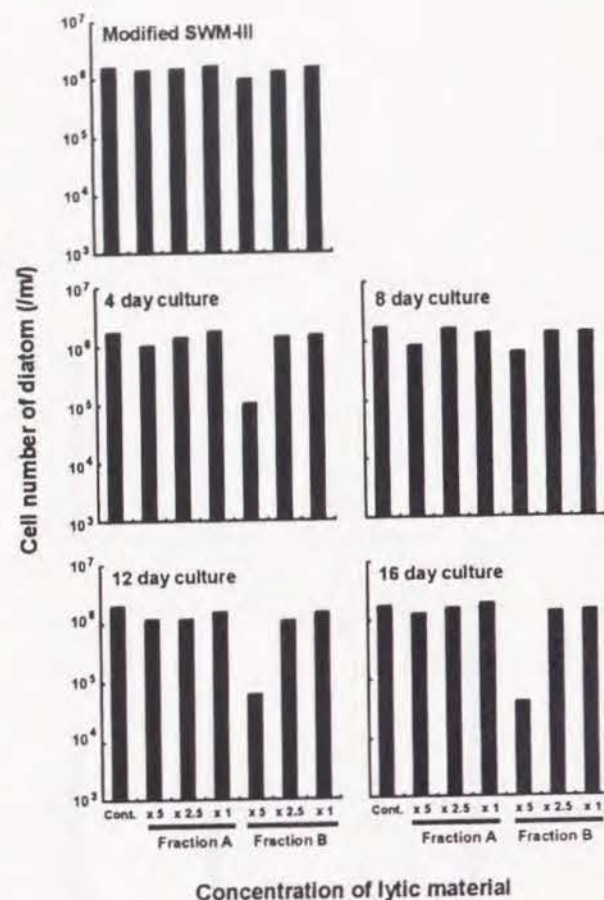


Fig. 3-14 Diatom lytic activity excreted in axenic culture fluid of *Skeletonema costatum* NIES-324. Culture fluid of *S. costatum* was collected after 4, 8, 12 and 16 days incubation and fractionated according to the procedure presented in Fig. 3-9. Black bar indicates the cell number of *S. costatum* cultivated with each fraction after 7 days of incubation. Each value indicates the average of the duplicates.

Fraction A と B の双方で、培養 7 日目に生残していた珪藻細胞の密度が、*S. costatum* の無菌培養液の両 Fraction と比べ有意に少なかった。また、A5Y 株については二者培養液の Fraction A のみで、A15, A16, A37, A43 及び A47 の 5 株については二者培養液の Fraction B のみで、培養 7 日目に生残していた珪藻細胞の密度が、*S. costatum* の無菌培養液の各 Fraction と比べ有意に少なかった。また、Fraction A で珪藻の死滅が見られた場合にはプロトプラストの出現が、Fraction B で死滅が見られた場合には *S.*

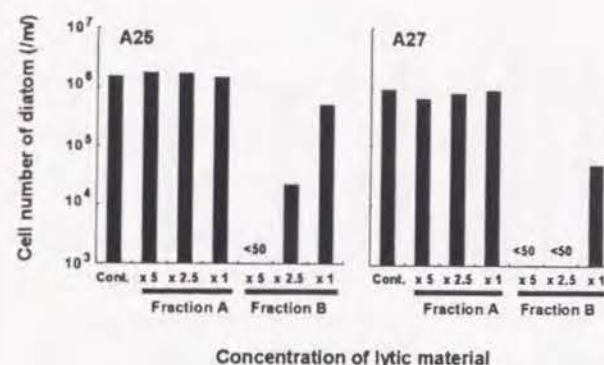


Fig. 3-15 Lysis of *Skeletonema costatum* NIES-324 by lytic material excreted in co-culture fluid. Co-culture fluid of *S. costatum* with diatom lytic *Alteromonas* sp. was collected after diatom was completely lysed and fractionated according to the procedure presented in Fig. 3-9. Black bar indicates the cell number of *S. costatum* cultivated with each fraction after 7 days of incubation. Each value indicates the average of the duplicates.

costatum の細胞内容物の消失がそれぞれ認められ、いずれも生菌を作用させた場合と死滅過程が同じであった。一方、A11, A13, A14, A17 及び A32 の 5 株については、二者培養液の Fraction A と B のいずれにおいても、培養 7 日目に至っても珪藻の溶解が認められなかった。

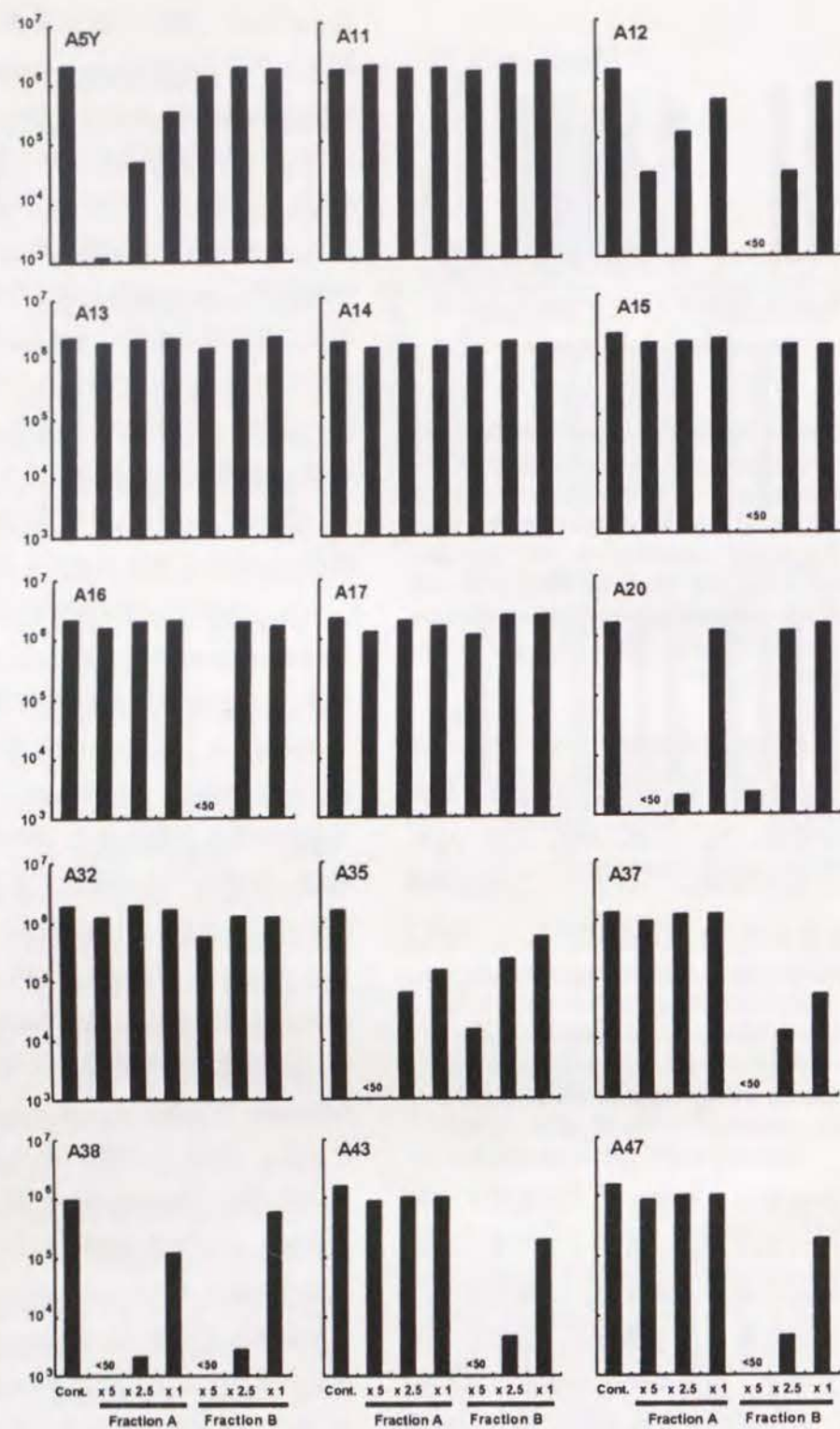
考 察

細菌が赤潮藻類を溶解もしくは殺菌する作用機作については、第 2 章第 4 節で論じた藍藻溶解性細菌の場合と同様に、細菌が宿主に接触して直接攻撃を行う場合と、宿主との接触を必要とせず、細菌の代謝産物によって宿主の溶解・殺菌が起こる場合の 2 通りが観察されている。

瀬戸内海播磨灘から単離された滑走細菌 *Cytophaga* sp. J18/M01 株は、同株がラフィド藻 *C. antiqua* を殺菌した後の二者培養液中に殺菌活性が認められなかったと報告されている

(Imai et al., 1993)。鹿児島湾沿岸海水から単離された滑走細菌 *Saprospira* sp. SS91-40 株は、珪藻 *Chaetoceros ceratosporum* との二者培養液中に殺菌活性が認められなかったと報告されている (坂田, 1994)。広島湾から単離された *Alteromonas* 属細菌 S 株と R 株は、それらの細菌が *C. antiqua* を完全に溶解した時点で集めた二者培養液が *C. antiqua* に対する殺菌効果を持たなかったと報告されている (Imai et al., 1995)。これらの細菌は、いずれも前者の作用機作を持つのではないかと考えられる。従って、これらの細菌の産生する殺菌性物質はいずれも特定されていない。

一方、餌料用珪藻の培養槽から単離された *Pseudomonas* sp. T827/2B 株は、細胞外に排出したタンパク分解酵素様の物質によって珪藻 *Thalassiosira pseudonanna* を溶解すると報告されている (Baker and Herson, 1978)。三重県五ヶ所湾から単離された *Alteromonas* sp. 6/6-46 株は、酢酸エチルで抽出できる低分子物質を細胞外に放出し、*G. mikimotoi* を殺菌すると報告されている (竹内ら, 1992)。高知県浦ノ内湾から単離された *Flavobacterium* sp. 5N-3 株は、水溶性の細胞外低分子物質によって *G. mikimotoi* を殺菌すると報告されている (深見と西島, 1994)。和歌山県田辺湾から単離され、暫定的に *Flavobacterium* 属と特定された海洋細菌 E-401 株は、細胞外に排出する高分子の殺菌性物質によって *G. mikimotoi* を殺菌すると報告されている (Yoshinaga et al., 1995a)。鹿児島湾から単離された *Alteromonas* sp. A91-39 株は、細胞外に放出する酢酸エチルで抽出される水溶性低分子物質によって *Chaetoceros ceratosporum* や *Chattonella marina* を死滅させると報告されている (坂田, 1995)。これらの細菌は、いずれも後者の作用機作を持つものと考えられる。しかしながら、これらの殺



Concentration of lytic material

Fig. 3-16 Lysis of *Skeletonema costatum* NIES-324 by lytic material excreted in co-culture fluid. Co-culture fluid of *S. costatum* with diatom lytic *Cytophaga* sp. was collected after diatom was completely lysed and fractionated according to the procedure presented in Fig. 3-9. Black bar indicates the cell number of *S. costatum* cultivated with each fraction after 7 days of incubation. Each value indicates the average of the duplicates.

藻性物質はいずれもまだ精製が完了していない。また、広島湾から単離された *Alteromonas* spp. K 株と D 株は、各々の細菌が *C. antiqua* を完全に溶解した時点で集めた二者培養液が、*C. antiqua* に対する殺藻効果を示すことから、やはり、代謝産物によって殺藻を行うものと考えられている (Imai et al., 1995)。

以上のように、これまでに単離された赤潮藻類溶解性・殺藻性細菌の持つ作用機作は様々であるが、滑走細菌については前者の作用機作を持つものが、真正細菌については後者の作用機作を持つものが多いという傾向が窺える。しかしながら、これらの作用機作については、各海域から単離された代表的な菌株 1 株についてのみ検討が行われている場合が多く、同一海域から得られ簡易同定により同属とされた複数の単離株について検討が行われた例は、広島湾から単離された 4 株の *Alteromonas* 属細菌 (Imai et al., 1995) のみであり、近縁な細菌間で作用機作にどの程度の多様性が見られるのかについては、極めて情報が少ない。そこで本研究においては、有明

海から単離され、簡易同定された珪藻溶解性細菌のうち、*Alteromonas* 属 6 株及び *Cytophaga* 属 15 株について、*S. costatum* NIES-324 株に対する作用機作を調べると共に、それらがどの程度の多様性を示すのかについても検討を行った。

S. costatum を主要構成種とする赤潮の発生初期段階に当たる 1994 年 8 月 22 日に単離された 4 株を含む 6 株の *Alteromonas* 属細菌は、いずれも、*S. costatum* の細胞に多数付着し (Fig. 3-10)、珪藻の細胞内容物を溶解・消失させるという、同一の溶解過程を示した。しかしながら、接触は溶解のための必要条件とはなっておらず、いずれもメンブレンフィルターで隔てられていても *S. costatum* を溶解できた (Fig. 3-13)。また、6 株のうち A25 と A27 株について、*S. costatum* 溶解後の二者培養液を分画し、いずれの画分に溶解活性が含まれるかを調べたところ、両株共に分子量 1 万未満かつ酢酸エチル可溶性の画分に活性が検出された (Fig. 3-15)。以上の結果から、これら 6 株の *Alteromonas* 属細菌は、珪藻の細胞に付着

Table 3-10 Relationship between the characteristics of the process of lysis of *Skeletonema costatum* NIES-324 by bacteria and the lytic activity excreted into co-culture fluid.

Characteristic of the process of lysis	Fractions where lytic activity is present			
	MW* is ≥ 10000	MW* is < 10000 and ethyl acetate soluble	Both fractions	Activity is not detected in both fractions
Appearance of protoplast	A5Y		A20	A11, A13, A14
Disappearance of the contents of diatom cell		A15, A16, A43, A37, A47		
Both of above			A12, A35, A38	A17, A32

*: molecular weight

し、細胞外に分泌する酢酸エチル可溶性の低分子溶解性物質を作用させて、珪藻の細胞内容物を消化・利用するという、単一の作用機作を持つものと判断された。酢酸エチルで抽出できる微細藻類溶解性・殺藻性物質は、他の海域から単離された *Alteromonas* 属細菌からも見出されている (竹内ら, 1992; 坂田, 1995) ことから、*Alteromonas* 属細菌の産生する一般的な溶解性・殺藻性物質ではないかと推察される。

一方、*S. costatum* を主要構成種とする赤潮の非発生時に当たる秋季から冬季に最も多く単離された *Cytophaga* 属細菌については、*S. costatum* 細胞の溶解過程を顕微鏡下で観察したところ、珪藻がプロトプラスト状に溶解される場合 (Fig. 3-11)、珪藻の細胞内容物が消失して死滅する場合 (Fig. 3-12)、及びその両方が同時に見られる場合の 3 通りの過程が観察された。さらに、二者培養液中の溶解活性が存在するかどうか、またろ液中のどのような画分に活性が存在するかなどの特徴によって整理を行った結果、これら 15 株を 6 つのグループに類別できた (Table 3-10)。

顕微鏡観察によってプロトプラスト化のみが観察された 5 株のうち、A5Y 株と A20 株は分子量 1 万以上の画分に溶解活性が認められた (Fig. 3-16) ことから、細菌の産生する高分子の溶解性物質によって珪藻の細胞がプロトプラスト化されるものと推察される。残りの A11, A13 及び A14 の 3 株は、二者培養液中の分子量 1 万以上及び分子量 1 万未満かつ酢酸エチル可溶性の画分のいずれにも活性が認められなかった (Fig. 3-16)。これら 3 株については、今回活性を調べていない分子量 1 万未満かつ酢酸エチル不溶性の画分に溶解活性が含まれている可能性も考えられるが、*S. costatum* の溶解過程が前者の 2 株と同じであ

ること、また前者の 2 株についても細胞の先端部を *S. costatum* の細胞に付着させている様子が顕微鏡下でしばしば観察されることから、むしろこれら 5 株はいずれも *S. costatum* の細胞に接触することによって高分子の溶解性物質を高濃度で作用させこれをプロトプラスト化するのであって、A5Y 株と A20 株で二者培養液中に活性が見られるのは、過剰に産生された溶解性物質が培養液中に溶出した結果に過ぎない、と考えた方が妥当ではないかと思われる。

二者培養液の顕微鏡観察によって *S. costatum* の細胞内容物の消失のみが認められた 5 株は、いずれも二者培養液中の分子量 1 万未満かつ酢酸エチル可溶性の画分に溶解活性が認められた (Fig. 3-16) ことから、細胞外に放出する酢酸エチル可溶性の低分子溶解性物質の作用によって *S. costatum* の細胞内容物を溶解・利用するものと考えられる。*Alteromonas* 属細菌と *Cytophaga* 属細菌の一部が同じ作用機作をしめたことは興味深い。一方で、福岡県博多湾から単離された *S. costatum* が、自身の産生する酢酸エチルで抽出できる自己阻害物質によって、定常期に入ると急激に死滅するという報告もなされている (Imada et al., 1991)。この自己阻害物質は分離精製され、15-hydroxyecosapentaenoic acid と同定されている (Imada et al., 1992)。また、この自己阻害物質は、珪藻 *S. costatum* と *Chaetoceros costatus* 及びラフィド藻 *C. antiqua* と *C. marina* に対して強い溶解活性を示したが、珪藻 *D. brightwellii* と *Asterionella japonica* に対する活性は弱く、渦鞭毛藻 *Prorocentrum minimum* と *G. mikimotoi* に対しては活性を示さなかったと報告されている (Imada et al., 1991)。本研究において用いた *S. costatum* NIES-324 株は、同藻の無菌培養液中の分子量 1

万未満で酢酸エチルに可溶性の画分に弱い溶解活性が見られる (Fig. 3-14) もの、定常期に至っても死滅しない点で Imada らの単離株とは異なっている。しかしながら、有明海から単離された *Alteromonas* 属細菌と *Cytophaga* 属細菌は、珪藻の他にラフィド藻 *C. antiqua* に対して溶解活性を示すものが多いが *G. mikimotoi* に対しては活性を示さない (Tables 3-8 and 3-9) という点で、Imada ら (1991) の報告している自己阻害物質と、宿主域が類似していることが注目される。今回検出された酢酸エチル可溶性の低分子溶解性物質についても、細菌が溶解性物質を産生している可能性の他に、細菌が何らかの作用によって珪藻を自己溶解させている可能性も考えられる。この溶解性物質が細菌自身によって産生されているのか否か、またどのような条件下で産生されるのかなどについて、今後さらに検討を行っていく必要がある。

2 種類の溶解過程が同時に観察された 5 株については、A12, A35 及び A38 の 3 株は、両方の画分に活性が認められたが、A17 と A32 の 2 株は、どちらの画分にも活性が認められなかった (Fig. 3-16)。前者の 3 株については 2 種類の溶解性物質の両方の作用により *S. costatum* を溶解するものと判断される。後者の 2 株については、*S. costatum* の細胞に接触して少量の溶解性物質を有効に作用させ、これを溶解しているのではないかと推察される。

以上の結果から、これら 15 株の *Cytophaga* 属細菌の持つ作用機作は、同一ではなく、かなり多様であることが明らかとなった。細菌が単離された時期によってそれらの持つ作用機作に違いがあるかどうかを見てみると、1994 年～95 年に単離された菌株については、*S. costatum* をプロトプラスト化させる機作のみを示すものではなく、いずれも細胞内容物を

消失させる機作を持っているという傾向は見られたものの、特定の時期に単離された菌株が特定の作用機作を持つというような、明確な関連性は見出せなかった。むしろ、同時期に単離された菌株間においても、かなりの多様性が見られた。A11, A14 及び A15 の 3 株は同じ時期 (1992 年 1 月) に単離され、分類学的性状が類似しており (Table 3-7)、かつ 16SrDNA の制限酵素 *Hae* III による切断断片の RFLP パターンが同一である (芝, personal communication) ことから、分類学的には比較的近縁であると考えられるが、A11 株と A14 株は宿主に接触することによって高分子の溶解性物質を作用させ *S. costatum* をプロトプラスト化して溶解利用するのに対し、A15 株は酢酸エチルで抽出できる低分子の細胞外殺藻物質で *S. costatum* の細胞内容物を溶解利用するというように、珪藻溶解の作用機作が全く異なっていた。また、同一の調査日 (1994 年 11 月 21 日) に単離された A32, A35, A37 及び A38 の 4 株についても *Hae* III による切断断片の RFLP パターンが同一であったが、A35 株と A38 株は同一の作用機作を示したものの、A32 株は二者培養液中に溶解活性が認められない点で、A37 株は *S. costatum* の細胞をプロトプラスト化しない点で、それぞれ機作が異なっていた。これらの結果から、*Cytophaga* 属細菌に関しては、分類学的に比較的近縁な菌株間においても、珪藻に対する溶解の作用機作が多様化しているものと考えられた。

Alteromonas 属細菌が単一の作用機作を示し、*Cytophaga* 属細菌が多様な機作を示す理由については、現時点では明らかではない。しかしながら、少なくとも両属細菌の有明海における生態はかなり異なっているのではないかと想像される。今後、蛍光抗体や DNA プロブを用いたより鋭敏な検出法が開発され

ば、現場海域におけるこれらの細菌の挙動がより詳しく解明され、何らかの情報が得られるのではないかと期待される。また、これら *Alteromonas* 属細菌及び *Cytophaga* 属細菌について、珪藻との二者培養によって溶解の過程や溶解の作用機作をさらに詳細に検討するとともに、溶解性物質の分離精製を行い、それら物質の作用機作や、宿主域などを明らかにしていくことが望まれる。

第4節 摘要

(1) 冬季に珪藻赤潮がしばしば発生しノリ養殖に大きな被害を与えている有明海福岡県沿岸海域において、1989年12月20日から1990年2月28日にかけてのノリ養殖シーズンに、一般従属栄養細菌相の調査を行った。その結果、*Vibrio* 属細菌の比率が低く *Acinetobacter-Moraxella* 属細菌の比率が高いという、富栄養化した海域に特有の細菌相を示したほか、調査期間中に発生した珪藻 *S. costatum* の小規模なブルーム時に *Flavobacterium* 属細菌が優占し最高60%まで達したことが特徴的であった。一方、同定を行った462株の従属栄養細菌について、*S. costatum* に対する溶解活性を調べたところ、珪藻のブルーム時に優占していた *Flavobacterium* 属細菌はいずれも溶解活性を示さず、活性を示したのは *Cytophaga* 属細菌1株 (A5Y株) のみであった。

(2) 1992年1月から1995年2月にかけて冬季を中心に、珪藻 *S. costatum* NIES-324株を宿主に用いた重層寒天平板法によって珪藻溶解性微生物の現存量を調査した。*S. costatum* 溶解性微生物は、赤潮の非発生時には5以下～ 10^1 pfu/ml の低密度であったが、宿主と同種の *S. costatum* を主要構成種とする赤潮の発生初期段階に相当した1994年8月22日には

10^4 pfu/ml の高密度まで増加していた。一方 *Rhizosolenia* 属や *Chaetoceros* 属を主要構成種とする珪藻赤潮が発生した際には、*S. costatum* 溶解性微生物はやや増加する傾向を示したものの、 10^2 pfu/ml の低密度に留まった。

(3) できるだけ希釈段階の高い重層寒天平板上に出現したプラークから、*S. costatum* 溶解性微生物の優占種の単離を試み、32株の *S. costatum* 溶解性細菌を単離した。これらを簡易同定したところ、*Cytophaga* 属細菌が16株と最も多く、*Alteromonas* 属細菌が9株、*Flavobacterium* 属細菌が4株、*Pseudomonas* 属細菌が3株であった。*S. costatum* を主要構成種とする赤潮の発生初期段階に相当した1994年8月22日には、*Alteromonas* 属細菌のみが単離された。*S. costatum* を主要構成種とする赤潮の非発生時に相当した秋季から冬季には、*Cytophaga* 属細菌が多く単離されたものの、*Flavobacterium* 属細菌、*Pseudomonas* 属細菌及び *Alteromonas* 属細菌も単離されるなど *S. costatum* 溶解性細菌相は多様であった。

(4) *Alteromonas* 属細菌及び *Cytophaga* 属細菌の宿主特異性を調べたところ、いずれの菌株も宿主に用いた *S. costatum* を含む *Coscinodiscineae* 亜目 *Coscinodiscaceae* 科の珪藻を良く溶解し、異なる門に属する渦鞭毛藻 *G. mikimotoi* を溶解できない点で共通していたが、他亜目の珪藻や同じ門に属するラフィド藻 *C. antiqua* を溶解できるものも多く、これらの宿主特異性は比較的低かった。

Alteromonas 属細菌は、A25株を除く5株が同じ宿主域を示し、A25株が *D. brightwellii* を溶解した点でのみ異なっていたのに対し、*Cytophaga* 属細菌については、宿主に用いた *S. costatum* を含む *Coscinodiscineae* 亜目 *Coscinodiscaceae* 科の珪藻を良く溶解し、*G. mikimotoi* を溶解できない点で共通していた

が、他亜目の珪藻や同じ門に属するラフィド藻 *C. antiqua* に対しては、これらを溶解できる菌株とできない菌株が存在するなど、それらの宿主域は多様であった。

(5) 1994年夏季に単離した6株の *Alteromonas* 属細菌の *S. costatum* に対する溶解の作用機作を調べたところ、これらは、珪藻の細胞に付着し、細胞外に分泌する酢酸エチル可溶性の低分子溶解性物質を作用させて、珪藻の細胞

内容物を消化・利用するという、単一の作用機作を示した。

(6) 秋季から冬季に単離された16株の *Cytophaga* 属細菌の *S. costatum* に対する溶解の作用機作は、多様であり、高分子溶解性物質によって珪藻細胞をプロトプラスト化するものの、*Alteromonas* 属細菌と同様に、酢酸エチル可溶性の低分子溶解性物質によって珪藻細胞内容物を溶解利用するもの、及びその両者の機作を示すものの3通りが見られた。

第4章 総 括

諏訪湖や霞ヶ浦のような富栄養化の進んだ湖沼においては、夏季に藍藻の大増殖が発生し、水道水のカビ臭、浄水場でのろ過障害などの原因となっている。沿岸海域においては、ラフィド藻、渦鞭毛藻、珪藻などの赤潮がしばしば発生し、養殖業に大きな被害を与えている。このような藻類のブルームの発生・消滅については、光、水温、栄養塩濃度など、藻類の増殖に影響を及ぼすと考えられる物理的・化学的要因のみならず、他の藻類や細菌、動物プランクトンなどとの相互関係といった生物学的要因も重要な役割を果たしているものと考えられる。

ブルームの消滅に影響を及ぼす生物学的要因の一つに、微細藻類を溶解する活性を持つ微生物の存在が挙げられている。細菌、シアノバクテリア、アメーバ、糸状菌など、多様な微生物が藍藻を溶解する能力を持つことは、古くから知られている。中でも滑走細菌に関する報告は多く、*Lysobacter* 属、*Myxococcus* 属、*Cytophaga* 属及び *Flexibacter* 属細菌が藍藻を溶解する能力を持つと報告されている。また、これらの藍藻溶解性滑走細菌が湖沼における藍藻ブルームの消滅に関与している可能性も指摘されている。しかしながら、これらがどのような作用機作により藍藻ブルームの消滅過程に関与しているのかは、未だに明らかではない。一方、沿岸海域における赤潮藻類溶解性細菌に関しては、研究の歴史が浅く、まだまだ不明な点が多い。

そこで、本研究では湖沼及び沿岸海域に分布する微細藻類溶解性細菌の生理生態を明らかにすることを目的とし、日本の代表的富栄養湖である諏訪湖と近年富栄養化の進行が問題になっている琵琶湖南湖、また代表的な富

栄養化した内湾である有明海をフィールドに選り、重層寒天平板法により微細藻類溶解性微生物の現存量を調査し、それらと藻類ブルームとの関連性について検討した。また、重層寒天平板上に生じたプラークから微細藻類溶解性細菌を単離し、それらを無菌培養の微細藻類と二者培養することによって、細菌による溶解の作用機作について検討した。

その結果、琵琶湖や諏訪湖では、まず現存量調査によって、現場で毎年発生している藍藻ブルームに依存した生態を持つ藍藻溶解性滑走細菌群が存在すること、またその現存量はブルームの発生に伴って増加し 10^4 pfu/ml の密度に達することが示された。重層寒天平板法によって得られた値は過少評価になっている可能性が強いことから、実際にはそれ以上の細胞密度で存在しているものと考えられる。また、単離した代表的な滑走細菌 *Lysobacter* sp. LB-1 株の持つ藍藻溶解の作用機作を調べた結果、同株が藍藻溶解活性を有するセリンプロテアーゼを細胞外に産生すること、また糸状藍藻をばらばらにし、その細胞を塊状にトラップし、その回りに密集してプロテアーゼを作用させるという、流動拡散系である水中において極めて効率的と考えられる作用機作を持つことが明らかになった。さらに、同株と藍藻 *Anabaena cylindrica* M-1 (IAM) 株との二者培養によって藍藻溶解の過程を詳細に検討した結果、同株は、藍藻細胞が活発に増殖している間は藍藻の放出する EOM (extracellular organic matter) を利用して増殖するが、藍藻が定常期に入ると EOM の供給が止まると一旦増殖を停止し、藍藻の生理状態が悪化すると、今度は藍藻細胞自体を溶解し、溶出してくる有機物を利用してさらに

増殖するという、日和見感染的な作用機作を示すことが明らかになった。

以上の知見から、琵琶湖や諏訪湖における藍藻溶解性滑走細菌の生態は、以下のように推察される。藍藻溶解性滑走細菌は、藍藻のブルームの非発生時には溶存態の有機物を利用して低密度で生存し、夏季の藍藻ブルーム発生時には、藍藻の放出する大量の EOM を利用して高密度まで増殖する。藍藻細胞の生理状態が悪化するブルームの消滅期には、高密度で存在している溶解性滑走細菌は、藍藻細胞自体を溶解・利用することによってブルームの消滅を加速させる働きをしたのち、ブルーム消滅後には減少して再び低密度で生存する。

一方、有明海で、珪藻 *Skeletonema costatum* NIES-324 株を宿主に用いて現存量調査を行ったところ、*S. costatum* 溶解性微生物 (実質的には細菌) は、赤潮の非発生時には 5 未満～ 10^1 pfu/ml の低密度で推移し、宿主と同種の *S. costatum* を主要構成種とする赤潮の発生初期状態を示していた 1994 年 8 月 22 日には 10^4 pfu/ml の高密度まで増加していたのに対し、冬季に *Rhizosolenia* 属や *Chaetoceros* 属の珪藻を主要構成種とする珪藻赤潮の発生した際には 10^2 pfu/ml の密度までしか増加しなかった。この結果から、有明海沿岸海域には、*S. costatum* の赤潮に依存した生態を持つ珪藻溶解性細菌群が存在している可能性が示唆される。次に *S. costatum* 溶解性細菌を単離し、簡易同定及び性状検査を行ったところ、1994 年の夏季に単離された細菌は全て *Alteromonas* 属細菌であり、特に 8 月 22 日に単離された *Alteromonas* 属細菌は分類学的性状が極めて類似していた。これらの *Alteromonas* 属細菌の *S. costatum* に対する溶解の作用機作を調べた結果、いずれの菌株も、*S. costatum* の細胞に付

着して細胞外に放出する酢酸エチル可溶性の低分子溶解性物質を作用させ、その細胞内容物を溶解・利用するという、流動拡散系である海水中において有効と考えられる同一の作用機作を持つことが明らかになった。一方、*S. costatum* を主要構成種とする赤潮の非発生時に当たる秋季から冬季には、*Cytophaga* 属細菌が多く単離されたものの、*Flavobacterium* 属細菌、*Pseudomonas* 属細菌及び *Alteromonas* 属細菌も単離されるなど溶解性細菌相は多様であった。この時期に最も多く単離された *Cytophaga* 属細菌について、分類学的性状、宿主特異性及び珪藻溶解の作用機作を調べたところ、これらの分類学的性状は単離された時期によってかなり異なっており、宿主域や *S. costatum* に対する溶解の作用機作もまた多様であることが明らかになった。有明海には、極めて多様な珪藻溶解性細菌が生息していることが示唆される。

以上の知見から有明海沿岸海域における珪藻溶解性細菌の生態は、以下のように推察される。海水中には多様な珪藻溶解性細菌群が存在しており、ある珪藻赤潮の発生時には、何らかの条件によって、その中からある特定の細菌群が選択的に増加してきて優占種となる。この細菌群が溶解活性を発揮することによって珪藻赤潮の消滅過程に影響を及ぼしている可能性も考えられる。

湖沼と沿岸海域で得られた知見を比較すると、琵琶湖や諏訪湖では、ブルーム発生時・非発生時を問わず滑走細菌のみが検出されたのに対し、有明海沿岸海域では用いた宿主と同種の赤潮が発生した時にのみ、同じ分類学的性状と宿主域を持つ *Alteromonas* 属細菌が優占しており、それ以外の時期には、分類学的性状についても宿主域についても極めて多様な珪藻溶解性細菌が存在していた点が、際立

って異なっていた。このような違いが見られた理由のひとつとして、諏訪湖のような富栄養化した湖沼では、夏季に特定の藍藻（諏訪湖では *Microcystis* 属）が必ずブルームを形成するという、毎年決まったパターンで微細藻類の遷移が起こるのに対し、有明海では珪藻赤潮が頻発しているものの、その主要構成種は様々であり、また多種の珪藻からなる複合赤潮であることが多く、さらには発生時期も不定期であるというように、微細藻類の遷移現象が湖沼と比べるとはるかに複雑多様であるという点が挙げられる。このような水域の特性の違いによって、湖沼では微細藻類と微細藻類溶解性細菌との相互関係が比較的単純化しているのに対し、有明海においては多様な微細藻類と多様な微細藻類溶解性細菌との間に、複雑にからみあった相互関係が形成されているものと推察される。ある特定の珪藻が異常増殖して赤潮状態となった場合には、何らかの条件によってその複雑な相互関係のバランスが崩れ、ある特定の相互関係のみが増幅される結果、ある特定の珪藻溶解性細菌

が急激に増加してきて優占種となるものと想像される。

今後は、各水域における主要な微細藻類溶解性細菌（琵琶湖と諏訪湖においては *Lysobacter* 属細菌、有明海においては *Alteromonas* 属細菌と *Cytophaga* 属細菌）を特異的かつ鋭敏に検出できる蛍光抗体やDNAプローブなどを作成し、それらを用いて、直接現場水域において微細藻類溶解性細菌の動態と藍藻ブルームや珪藻赤潮との関係を調べることが必要であろう。それによって、微細藻類と微細藻類溶解性細菌との相互関係が、より明確になることが期待される。また、珪藻溶解性細菌については、その産生する高分子や低分子の溶解性物質を分離精製すると共に、それらの産生条件や作用機作を明らかにすることが望まれる。このような基礎データの積み重ねによって、微細藻類溶解性細菌の「環境にやさしい微生物農薬」としての利用法のアイディアも浮かんでくるのではないかと期待される。

Summary and Conclusions

Ecological and physiological studies on algae lytic bacteria in lakes and coastal waters

Atsushi Mitsutani

In eutrophic lakes such as Lake Suwa and Southern Lake Biwa, blooms of cyanobacteria have occurred in every summer seasons and have become an object of public concerns, especially moldy taste and odor problems in drinking water. In the Ariake Sea, one of the representative eutrophic coastal waters in Japan, blooms of diatoms have frequently occurred in winter seasons and have damaged to the production of Nori (*Porphyra* spp.) due to the competition between diatom and Nori for utilization of dissolved inorganic nutrients

As to the mechanisms by which algal blooms develop and decompose, many detailed studies have been reported about the physical and chemical parameters, which may affect algal growth and primary production. A few studies have been reported from the viewpoint of the interactions of microorganisms, for example, interactions between algae and lytic microbes.

Various microbes, such as bacteria, phages, actinomycetes, fungi, and amebae have been known to have the ability to lyse cyanobacteria. They were considered to play important roles in regulating the bloom of cyanobacteria. In this study, seasonal fluctuation of the abundance of such algae lytic microbes, especially bacteria, was investigated by double-layered agar technique in Lake Biwa, in Lake Suwa and in the Ariake Sea and mechanism of the lysis of algae by isolated lytic bacteria was examined by coculture method in order to know whether the decomposition of algal blooms in lakes and coastal waters was really affected by these algae lytic bacteria.

I. Ecology and physiology of cyanobacteria lytic gliding bacteria in Lake Biwa and Lake Suwa

(1) Seasonal fluctuation of the abundance of cyanobacteria lytic microbes was investigated in relation to that of bloom-forming cyanobacteria at two stations in Southern Lake Biwa in 1985 and at Mesocosm sited in Lake Suwa in 1985 and 1986. *Anabaena cylindrica* M-1 (IAM) was used as a host cyanobacterium for the detection of lytic microbes in 1985, whereas *Microcystis aeruginosa* NIES-99 was used in 1986. In Lake Biwa, the numbers of the lytic microbes in surface water were in a range from 10^2 to 10^4 pfu/ml at Yabase station and from 10^2 to $>10^4$ pfu/ml at Shimosakamoto station. At both stations, especially at Yabase station,

fluctuation of the number of the lytic microbes was correlated well with those of chlorophyll-a concentration and the cell number of *Anabaena solitaria*, bloom-forming species in this lake. In Lake Suwa, the number of the lytic microbes in surface water was in a range from 10^0 to 10^4 pfu/ml and the fluctuation of it was correlated well with that of chlorophyll-a concentration in surface water in 1986, when *M. aeruginosa*, bloom-forming species in this lake, was used as a host. The number of lytic microbes in surface water was in a range from 10^1 to 10^2 pfu/ml and the fluctuation of it was not correlated with that of chlorophyll-a concentration in 1985, when *A. cylindrica*, which had never been a dominant species in Lake Suwa, was used as a host.

(2) Bacteria always occupied the majority in the cyanobacteria lytic microbes in both lakes. Eight strains of cyanobacteria lytic bacteria were isolated from Lake Biwa and 21 strains were isolated from Lake Suwa. These 29 strains and a strain (LB-1) isolated from the surface water at Shimosakamoto station in 1984 were gliding bacteria. LB-1 was identified as *Lysobacter* sp. by its high G+C content (67%) of DNA and inability to form fruiting body or myxospore. Nine strains from Lake Biwa and 11 strains from Lake Suwa isolated in 1984 and 1985 by using *A. cylindrica* M-1 (IAM) as the host indicated specific lytic activity against cyanobacteria belonging to order Nostocales including *Anabaena solitaria*, bloom forming species in Lake Biwa, whereas 10 strains isolated from Lake Suwa by using *M. aeruginosa* NIES-99 as the host in 1986 indicated specific lytic activity against cyanobacteria belonging to order Chroococcales including *M. aeruginosa*.

(3) A protease was purified from the culture filtrate of a cyanobacteria lytic bacterium *Lysobacter* sp. LB-1 isolated from Lake Biwa in 1984 by ammonium sulfate precipitation, anion-exchange chromatography, cation-exchange chromatography (first), hydrophobic chromatography, cation-exchange chromatography (second), and gel filtration in order. The protease was purified 36-fold, and the final yield of it was 4.0%. A molecular weight of the purified enzyme (LB-1 protease A) was estimated as 32,000 from the elution volume at gel filtration. Optimum temperature and pH of the enzyme were 50–60°C and 10–11, respectively. The enzyme was strongly inhibited by phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) and weakly inhibited by antipain, but not inhibited by ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), pepstatin, leupeptin, and phosphoramidon. The enzyme was considered to be concerned in the lysis of cyanobacterial cell by the bacterium, because it could lyse the cell of *A. cylindrica* strain M-1 (IAM) treated in sodium dodecyl sulfate solution at 100°C.

(4) The process of the lysis of *A. cylindrica* M-1 (IAM) by *Lysobacter* sp. LB-1 was examined in coculture. The number of LB-1 increased rapidly (up to about 5×10^6 cells/ml) after it was inoculated to the culture of *A. cylindrica* without lysing cyanobacterial cells possibly by using extracellular organic matter (EOM) excreted by *A. cylindrica*. The growth of LB-1 once reached stationary phase and the number of LB-1 increased again after *A. cylindrica* reached stationary phase. With the increase of the number of LB-1, many green clumps appeared in coculture. The center of these clumps contained partially lysed cells of *A. cylindrica* and the surface of clumps was covered by a great number of LB-1. Clumps increased in number and in size with the

progress of lysis. Clumps spontaneously disappeared with the completion of the lysis of *A. cylindrica*. *Lysobacter* sp. LB-1 was considered to be an opportunistic pathogen of cyanobacteria, because stationary phase cell of *A. cylindrica* M-1 (IAM) was susceptible to protease produced by LB-1, whereas log phase cell of it was resistant to protease.

II. Ecology and physiology of diatom lytic bacteria in coastal waters of the Ariake Sea.

(1) Changes in bacterial flora in surface and bottom waters at two stations sited in the Ariake Sea were examined to investigate the relationship between bacteria and bloom-forming diatoms from December, 1989, through February, 1990. *Flavobacterium* was dominant (up to 60%) during the period of small scale bloom of a diatom *Skeletonema costatum*. Four hundred and sixty two strains of isolated heterotrophic bacteria were screened as to the ability to lyse *S. costatum* NIES-324. Among them a strain (A5Y) indicated strong lytic activity against *S. costatum*. It was identified as *Cytophaga* sp. by its gliding motility and low G+C content (32.7%) of DNA. Other strains including 204 strains of *Flavobacterium* which were dominant heterotrophic bacteria during the bloom of *S. costatum* did not indicate lytic activity against *S. costatum* NIES-324. It was assumed that *Flavobacterium* did not contribute directly to the decomposition of the bloom.

(2) Seasonal fluctuation of the abundance of diatom lytic microbes was investigated in relation to that of bloom-forming diatoms at two stations in coastal waters of the Ariake Sea from January, 1992, through February, 1995, mainly in winter seasons. *S. costatum* NIES-324 was used as a host for the detection of lytic microbes. At both stations, the number of the lytic microbes in water sample was in a range from <5 to 10^4 pfu/ml. The number of diatom lytic microbes significantly increased (up to 10^4 pfu/ml) on August 22, 1994, when a bloom of diatoms, in which *S. costatum* was dominant, was rising, whereas it slightly increased (up to 10^2 pfu/ml) when blooms, in which diatoms belonging to suborder Biddulphiineae such as *Rhizosolenia* sp. or *Chaetoceros* sp. were dominant, occurred in winter seasons. Because bacteria always occupied the majority in the diatom lytic microbes during sampling periods, 32 strains of diatom lytic bacteria were isolated. Among them, 16 strains were identified as *Cytophaga* spp., 9 were as *Alteromonas* spp., 4 were as *Flavobacterium* spp. and 3 were as *Pseudomonas* spp., respectively. *Alteromonas* spp. was dominant in diatom lytic bacteria during the summer season of 1994 and only *Alteromonas* spp. was detected on August 22, 1994, whereas dominant genus was not clear in the fall and winter seasons. Host specificity of 6 strains of *Alteromonas* spp. isolated during the summer season of 1994 and 16 strains of *Cytophaga* spp. isolated during the fall and winter seasons was examined. All of them could lyse diatoms belonging to suborder Coscinodiscineae including *S. costatum*, and could not lyse *Gymnodinium mikimotoi* (Dinophyceae). However, a variety of host range against diatoms belonging to suborder Biddulphiineae and *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae) was observed.

(3) The process of the lysis of *S. costatum* NIES-324 by 6 strains of *Alteromonas* spp. isolated during the summer season of 1994 and 16 strains of *Cytophaga* spp. was examined microscopically. *Cytophaga* spp. indicated three types of the process, 1) appearance of protoplasts, 2) disappearance of the contents of diatom cell, 3) both appearance of protoplasts and disappearance of cell contents, whereas 6 strains of *Alteromonas* spp. indicated the same process, disappearance of cell contents. Their coculture filtrates were fractionated and the existence of lytic activity in each fraction was examined. As to many of bacteria indicated the process of type 1), lytic activity was detected in the fraction of high molecular weight (>10000). As to many of bacteria indicated the process of type 2), lytic activity was detected in the fraction of low molecular weight (<10000) and ethyl acetate soluble. It was suggested that the difference of the process of lysis was derived from the difference of the lytic material produced by bacteria.

From the results of this study, it was confirmed that a group of cyanobacteria lytic gliding bacteria that has strong and specific lytic activity against bloom-forming cyanobacterium increased in number (up to 10^4 pfu/ml) with the development of the cyanobacterial bloom in Lake Biwa and Lake Suwa. In the Ariake Sea, it was revealed that a great variety of diatom lytic bacteria was distributed in the coastal waters, and with the development of the bloom of diatoms, particular group of lytic bacteria which had strong lytic activity against dominant species in bloom-forming diatoms increased in number (up to 10^4 pfu/ml) and became dominant in diatom lytic bacteria. It is suggested that the decomposition of algal blooms in lakes and coastal waters is affected by these algae lytic bacteria.

謝 辞

本研究をまとめるにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました京都大学農学部教授 石田祐三郎先生に心からお礼申し上げます。

本研究の遂行にご理解とご鞭撻を賜りました前水産大学校教授（現 下関女子短期大学教授） 武居 薫先生に深く感謝の意を表します。

研究遂行上、有益なるご助言を賜りました京都大学農学部名誉教授 門田 元先生、前京都大学農学部教授（現 水産環境微生物研究所）吉田陽一先生、京都大学農学部教授 中原紘之先生、京都大学農学部助教授 内田有恒先生、京都大学農学部助教授 今井一郎先生、京都大学農学部講師 左子芳彦先生、京都大学農学部助手 吉永郁生先生、高知大学農学部助教授 深見公雄先生、水産大学校教授 高橋幸則先生、水産大学校助教授 上野俊士郎先生、水産大学校助教授 伊丹利明先生、水産大学校助教授 芝 恒男先生、水産大学校助手 前田俊道先生に謹んで謝意を表します。

現場調査にあたり、多大なご協力を頂きました福岡県水産海洋技術センター有明海研究所の切田正憲様（現 福岡県水産海洋技術センター）、本田一三様、本田清一郎様（現 福岡県水産海洋技術センター筑前海研究所）、山本千裕様（現 福岡県庁）、白石日出人様に厚くお礼申し上げます。

さらに、貴重な単離株を分譲して頂きました元京都大学農学部教授 故 梅崎 勇先生、京都市水道局 根来様、神戸大学理学部 松田先生、水産庁南西海区水産研究所 山口峰生様に厚くお礼申し上げます。

また、実験にご助力頂いた藤岡耕太郎氏、橋本宗明氏、吉田憲正氏、倉 尚樹氏、中島哲郎氏、湯川耕治氏、畔地和久氏、渡辺智人氏、飯村 勤氏、志賀隆顕氏、吉武研二氏、岡田靖則氏、木所英昭氏、鳥井正也氏、金子信也氏、高須雄二氏、戸嶋忠良氏、竹内留美氏、中谷正男氏、石樋由香氏、玉井敦司氏、盛田 信氏、上野誓子氏、浦邊清治氏、中山博志氏に心よりお礼申し上げます。

文 献

- 青山莞爾, 1985. 植物プランクトンの組成構造と現存量. メソコスムによる水域生物相互作用系の実験的解析研究報告集, 昭和 60 年度文部省科学研究費特定研究 (課題番号 60129034), pp.29-38, 文部省.
- Baker, K.H. and D.S. Herson, 1978. Interactions between the diatom *Thalassiosira pseudonanna* and an associated pseudomonad in a mariculture system. *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 791-796.
- Barnet, Y.M., M.J. Daft and W.D.P. Stewart, 1981. Cyanobacteria-cyanophage interactions in continuous culture. *J. Appl. Bacteriol.*, **51**, 541-552.
- Burnham, J.C., T. Steak and G. Locher, 1976. Extracellular lysis of the blue-green alga *Phormidium luridum* by *Bdellovibrio bacterioborus*. *J. Phycol.*, **12**, 306-313.
- Burnham, J.C., S.A. Collart and B.W. Highson, 1981. Entrapment and lysis of the cyanobacterium *Phormidium luridum* by aqueous colonies of *Myxococcus xanthus* PC02. *Arch. Microbiol.*, **129**, 285-294.
- Burnham, J.C., S.A. Collart and M.J. Daft, 1984. Myxococcal predation of the cyanobacterium *Phormidium luridum* in aqueous environments. *Arch. Microbiol.*, **137**, 220-225.
- Cannon, R.E., M.S. Shane and J.M. Whitaker, 1976. Interaction of *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae) and the LPP-cyanophages in continuous culture. *J. Phycol.*, **12**, 418-421.
- Cannon, R.E., 1983. Aerosol release of cyanophages and coliforms from activated sludge basins. *J. WPCF.*, **55**, 1070-1074.
- Canter, H.M. and L.G. Willoughby, 1964. A parasitic *Blastocladia* from Windermere plankton. *J. Roy. Microscopic Soc.*, **83**, 365-372.
- Canter, H.M., 1972. A guide to the fungi occurring on planktonic blue-green algae. In: Taxonomy and biology of blue-green algae, (edited by T.V. Desikachary), pp. 145-158. University of Madras.
- Charney, J. and R.M. Tomarelli, 1947. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J. Biol. Chem.*, **171**, 501-505.
- Christensen, P. and F.D. Cook, 1978. *Lysobacter*, a new genus of nonfruiting, gliding bacteria with a high base ratio. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **29**, 367-393.
- Chróst R.J. and D. Brzeska, 1978. Extracellular release of organic products and growth of bacteria in *Anabaena cylindrica* (blue-green alga) culture. *Acta Microbiol. Polon.*, **27**, 287-295.
- Daft, M.J., J. Begg and W.D.P. Stewart, 1970. A virus of blue-green algae from freshwater habitats in Scotland. *New Phytol.*, **69**, 1029-1035.
- Daft, M.J. and W.D.P. Stewart, 1971. Bacterial pathogens of freshwater blue-green algae. *New Phytol.*, **70**, 819-829.
- Daft, M.J. and W.D.P. Stewart, 1973. Light and electron microscope observations on algal lysis by bacterium CP-1. *New Phytol.*, **72**, 799-808.
- Daft, M.J., S.B. McCord and W.D.P. Stewart, 1973. The occurrence of blue-green algae and lytic bacteria at a waterworks in Scotland. *Water Treatment and Examination*, **22**, 114-124.
- Daft, M.J., S.B. McCord and W.D.P. Stewart, 1975. Ecological studies on algal-lysing bacteria in fresh waters. *Freshwat. Biol.*, **5**, 577-596.
- Daft, M.J., J.C. Burnham and Y. Yamamoto, 1985. Lysis of *Phormidium luridum* by *Myxococcus fulvus* in continuous flow cultures. *J. Appl. Bacteriol.*, **59**, 73-80.
- Dobson, W.J. and H.D. McCurdy, 1979. The function of fimbriae in *Myxococcus xanthus*. I. Purification and properties of *M. xanthus* fimbriae. *Can. J. Microbiol.*, **25**, 1150-1158.
- Dobson, W.J., H.D. McCurdy and T.H. MacRae, 1979. The function of fimbriae in *Myxococcus xanthus*. II. The role of fimbriae in cell-cell interactions. *Can. J. Microbiol.*, **25**, 1359-1372.
- Drews, G. and J. Weckesser, 1982. Function, Structure and composition of cell walls and external layers. In: The biology of cyanobacteria, (Edited by N.G. Carr and B.A. Whitton), pp.333-357, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Dworkin, M. and S.M. Gibson, 1964. A system for studying microbial morphogenesis : rapid formation of microcysts in *Myxococcus xanthus*. *Science*, **146**, 243-244.
- Dworkin, M., 1973. Cell-cell interactions in the myxobacteria. In: Microbial differentiation, Soc. Gen. Microbiol. Symp., (edited by J.M. Ashworth and J.E. Smith), Vol. 23, pp.125-142, Cambridge University Press, Cambridge.
- 絵面良男, 1990. 海洋細菌の簡易同定. 沿岸環境調査マニュアル II [水質・微生物編], (日本海洋学会編), pp.357-364, 恒星社厚生閣, 東京.
- Fallon, R.D. and T.D. Brock, 1979a. Decomposition of blue-green algal (cyanobacterial) blooms in Lake Mendota, Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 820-830.
- Fallon, R.D. and T.D. Brock, 1979b. Lytic organisms and photo-oxidative effects. Influence on blue-green algae (cyanobacteria) in Lake Mendota, Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 499-505.
- Fraleigh, P.C. and J.C. Burnham, 1988. Myxococcal predation on cyanobacterial populations: nutrient effects. *Limnol. Oceanogr.*, **33**, 476-483.
- Fukami, K., T. Nishijima, H. Murata, S. Doi and Y. Hata, 1991. Distribution of bacteria influential on the development and the decay of *Gymnodinium nagasakiense* red tide and their effects on algal growth. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 2321-2326.
- Fukami, K., A. Yuzawa, T. Nishijima and Y. Hata, 1992. Isolation and properties of a bacterium inhibiting the growth of *Gymnodinium nagasakiense*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 1073-1077.
- 深見公雄・西島敏隆, 1994. 赤潮プランクトンの種のい選択的増殖及び優占種の遷移現象におけるバクテリアの関与試験. マリンバイオテクノロジーによる赤潮被害防止技術開発試験, 平成 5 年度赤潮対策技術開発試験報告書, pp.61-69, 水産庁.
- 深見公雄・西島敏隆, 1995. 赤潮プランクトンの種のい選択的増殖及び優占種の遷移現象におけるバクテリアの関与試験. マリンバイオテクノロジーによる赤潮被害防止技術開発試験, 平成 6 年度赤潮対策技術開発試験報告書, pp.101-112, 水産庁.

古城方和, 1992. 平成元年度～3 年度海洋の環境保全技術共同研究開発研究成果報告書, pp.1-37, 兵庫県海洋環境保全技術応用研究協議会.

Gibson, C.E. and R.V. Smith, 1982. Freshwater plankton. In: The biology of cyanobacteria, (edited by N.G. Carr and B.A. Witton) pp.463-489. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Gnossopelius, G., 1978. Purification and properties of an extracellular protease from *Myxococcus virescens*. *J. Bacteriol.*, **133**, 17-25.

Granhall, U. and B. Berg, 1972. Antimicrobial effects of *Cellvibrio* on blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.*, **84**, 234-242.

Gromov, B.V., O.G. Ivanov, K.A. Mamkaeva and I.A. Avilova, 1972. A flexibacter that lyses blue-green algae. *Microbiol.*, **41**, 952-956.

Harcke, E., A. Hüttermann and A. Kühlwein, 1971. Studies on lytic activities of *Chondrococcus coralloides* (Myxobacteriales) I. Purification and some properties of the bacteriolytic and proteolytic activity. *Arch. Mikrobiol.*, **77**, 86-95.

林秀剛・寺沢恭子・大槻晃, 1985. 昭和 60 年度諏訪湖メソコスム実験ルーチン観測結果, メソコスムによる水域生物相互作用系の実験的解析研究報告集, 昭和 60 年度文部省科学研究費特定研究 (課題番号 60129034), pp.164, 文部省.

Hedges, A. and R.S. Wolfe, 1974. Extracellular enzyme from Myxobacter AL-1 that exhibits both β -1,4-glucanase and chitosanase activities. *J. Bacteriol.*, **120**, 844-853.

Hüttermann, A., 1969. Studies on a bacteriolytic enzyme of *Archangium violaceum* (Myxobacteriales). II. Partial purification and properties of the enzyme. *Arch. Mikrobiol.*, **67**, 306-317.

Imada, N, K. Kobayashi, K. Tahara and Y. Oshima, 1991. Production of an autoinhibitor by *Skeletonema costatum* and its effect on the growth of other phytoplankton. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 2285-2290.

Imada, N, K. Kobayashi, K. Isomura, H. Saito, S. Kimura, K. Tahara and Y. Oshima, 1991. Isolation and identification of an autoinhibitor produced by *Skeletonema scostatum*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 1687-1692.

Imai, I., Y. Ishida, S. Sawayama and Y. Hata, 1991. Isolation of a marine gliding bacterium that kills *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae). *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 1409.

Imai, I., Y. Ishida and Y. Hata, 1993. Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp., isolated from the coastal sea of Japan. *Mar. Biol.*, **116**, 527-532.

今井一郎, 1994. 細菌による海産真核微細藻類の殺滅. 防菌防黴, **22**, 485-491.

今井一郎, 1995. 有害赤潮ラフィド藻殺滅細菌の分離, および沿岸海域における殺藻微生物と赤潮ラフィド藻の動態. マリンバイオテクノロジーによる赤潮被害防止技術開発試験, 平成 6 年度赤潮対策技術開発試験報告書, pp.68-92, 水産庁.

Imai, I., Y. Ishida, K. Sakaguchi and Y. Hata, 1995. Algicidal marine bacteria isolated from northern Hiroshima Bay, Japan. *Fish. Sci.*, **61**, 628-636.

Ishida, Y. and H. Kadota, 1974. Ecological studies on bacteria in the sea and lake waters polluted with organic substances-I. Responses of bacteria to different concentration of organic substances. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **40**, 999-1005.

Ishida, Y. and H. Kadota, 1975. Ecological studies on bacteria in the sea and lake waters polluted with organic substances-II. Analysis of bacterial flora by use of chemostat. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **41**, 957-960.

石田祐三郎, 1982. 富栄養化と細菌の指標性. 沿岸海域の富栄養化と生物指標, (日本水産学会編), pp.11-26, 恒星社厚生閣, 東京.

石田祐三郎, 1994a. 微生物農薬をめざす赤潮殺滅微生物の研究の現状. 防菌防黴, **22**, 611-616.

石田祐三郎, 1994b. 赤潮藻の微生物学的防除に関する現状と将来. 赤潮と微生物—環境にやさしい微生物農薬を求めて, (石田祐三郎・菅原庸編), pp.9-21, 恒星社厚生閣, 東京.

Ishio, S., R.E. Mangindaan, M. Kuwahara and H. Nakagawa, 1989. A bacterium hostile to flagellates: identification of species and characters. In: Red tides: biology, environmental science, and toxicology, (edited by T. Okaichi, D.M. Anderson and T. Nemoto), pp.205-208, Elsevier, New York.

Jackson, R.L. and R.S. Wolfe, 1968. Composition, properties, and substrate specificities of Myxobacter AL-1 protease. *J. Biol. Chem.*, **243**, 879-888.

Katayama-Fujimura, Y., Y. Komatsu, H. Kuraishi, T. Kaneko, 1984. Estimation of DNA base composition by high performance liquid chromatography of its nuclease P1 hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 3169-3172.

木俣正夫・河合章・石田祐三郎, 1960. 海底泥土の採集法. 日本水産学会誌, **26**, 1227-1230.

切田正憲・山本千裕・本田一三, 1991. 有明海福岡県地先の冬季から春季にかけての珪藻プランクトンおよび細菌の挙動. マリンバイオテクノロジーによる赤潮被害防止技術開発試験, 平成 2 年度赤潮対策技術開発試験報告書, pp.8-15, 水産庁.

切田正憲・山本千裕・本田一三, 1992. 有明海における珪藻赤潮発生予察手法の精度の高度化. 赤潮ネットワークシステム実用化技術開発試験, 平成 3 年度赤潮対策結果検討会資料, 水産庁.

Kiser, D., 1979. Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5952-5956.

小島貞男, 1961. プランクトン藻類の凝集処理 (1) 凝集処理の室内実験. 水処理技術, **2**, 21-27.

駒形和男, 1985. 細菌 (1) —好気性細菌. 改訂版微生物の分類と同定 (下), (長谷川武治編), pp.99-161, 学会出版センター, 東京.

Lund, J.W.G., G.H.M. Jaworski and C. Butterwick, 1975. Algal bioassay of water from Blelham tarn, English lake district and the growth of planktonic diatoms. *Arch. Hydrobiol.*, suppl. **49**, 49-69.

前田広人, 1993. 琵琶湖のピコプランクトンを殺すウィルス. 遺伝, **47**, 7-9.

満谷淳, 1992. 有明海における細菌相調査及び Bioassay 試験による赤潮関与細菌の検索. マリンバイオテクノロジーによる赤潮被害防止技術開発試験, 平成 3 年度赤潮対策技術開発試験報告書, pp.96-111, 水産庁.

- 村田寿・境正・延東真・黒木暁・木村正雄・九万田一巳, 1989. *Chattonella marina* 赤潮防除剤の検討—特に過酸化水素と高度不飽和脂肪酸から発生するフリーラディカルの除去能. 日本水産学会誌, **55**, 1075-1082.
- Noren, B., 1960. Lytic activity on autoclaved and on intact eubacterial cells by a preparation U2D, obtained from a metabolic solution of *Myxococcus cirescens*. *Botaniska Notiser*, **113**, 320-336.
- Padan, E., M. Shilo and N. Kislev, 1967. Isolation of 'cyanophages' from freshwater ponds and their interaction with *Plectonema boryanum*. *Virology*, **32**, 234-246.
- Porter, K.G. and Y.S. Feig, 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, **25**, 943-948.
- Readhead, K. and S.J.L. Wright, 1978. Isolation and properties of fungi that lyse blue-green algae. *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 962-969.
- Rein, R.L., M.S. Shane and R.E. Cannon, 1974. The characterization of a *Bacillus* capable of blue-green bactericidal activity. *Can. J. Microbiol.*, **20**, 981-986.
- Riquelme, C.E., K. Fukami and Y. Ishida, 1987. Annual fluctuations of phytoplankton and bacterial communities in Maizuru Bay and their interrelationship. *Bull. Japan. Soc. Microb. Ecol.*, **2**, 29-37.
- Riquelme, C.E., K. Fukami and Y. Ishida, 1988. Effects of bacteria on the growth of a marine diatom, *Asterionella glacialis*. *Bull. Japan. Soc. Microb. Ecol.*, **3**, 29-34.
- Rosenberg, E. and M. Varon, 1984. Antibiotics and lytic enzymes. In: *Myxobacteria - development and cell interactions*, (edited by E. Rosenberg), pp.109-125, Springer-Verlag, New York.
- Safferman, R.S. and M.E. Morris, 1963. Algal virus isolation, *Science*, **140**, 679-680.
- Sakata, T., 1990. Occurrence of marine *Saprospira* sp. possessing algicidal activity for diatoms. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 1165.
- Sakata, T., Y. Fujita and H. Yasumoto, 1991. Plaque formation by algicidal *Saprospira* sp. on a lawn of *Chaetoceros ceratosporum*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 1147-1152.
- Sakata, T. and H. Yasumoto, 1992. Colony formation by algicidal *Saprospira* sp. on marine agar plates. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 2139-2143.
- 坂田泰造, 1994. *Saprospira* 属細菌による珪藻殺滅. 赤潮と微生物—環境にやさしい微生物農薬を求めて, (石田祐三郎・菅原庸編), pp.57-66 恒星社厚生閣, 東京.
- 坂田泰造, 1995. 海洋環境における殺藻微生物の検索と殺藻機作. マリンバイオテクノロジーによる赤潮被害防止技術開発試験, 平成6年度赤潮対策技術開発試験報告書, pp.172-183, 水産庁.
- Sakata, T. and K. Iwamoto, 1995. Isolation of marine algicidal microorganisms on diatom double layer agar plates. *Fish. Sci.*, **61**, 173-174.
- SCOR/UNESCO, 1966. Determination of phytosynthetic pigments in seawater. In: *Monographs on Oceanographic methodology*, Vol. 1., pp.69, UNESCO Publication Center, Paris.
- Shilo, M., 1970. Lysis of blue-green algae by *Myxobacter*. *J. Bacteriol.*, **104**, 453-461.

- Shimidu, U., K. Kogure and K. Tsukamoto, 1987. Distribution of Vibrionaceae in the sea. *Bull. Japan. Soc. Microb. Ecol.*, **1**, 65-74.
- 代田昭彦, 1977. 赤潮防止策. (特集) 海洋汚染, 産業と環境, **6**, 37-42.
- Sieburth, J.M., 1968. Observation on bacteria planktonic in Narragansett Bay, Rhode Island; resume. *Bull. Misaki Mar. Biol. Inst. Kyoto Univ.*, **12**, 47-64.
- Simon, R.D., 1977. Macromolecular composition of spores from the filamentous cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *J. Bacteriol.*, **129**, 1154-1155.
- Stewart, J. R. and R.M. Brown, 1969. *Cytophaga* that kills or lyses algae. *Science*, **164**, 1523-1524.
- Stewart, J.R. and R.M. Brown, 1970. Killing of green and blue-green algae by a non-fruiting myxobacterium, *Cytophaga* N-5. *Bact. Proc.*, **18**.
- Stewart, J.R. and R.M. Brown, 1971. Algicidal non-fruiting myxobacteria with high G+C ratios. *Arch. Mikrobiol.*, **80**, 176-190.
- Stewart, W.D.P. and M.J. Daft, 1976. Algal lysing agents of freshwater habitats. In: *Microbiology in agriculture, fisheries and food*, (edited by F.A. Skinner and J.G. Carr), pp.63-90. Academic Press, London.
- Stewart, W.D.P. and M.J. Daft, 1977. Microbial pathogens of cyanophycean blooms. In: *Advances in aquatic microbiology*, (edited by M.R. Droop and H.W. Jannasch), Vol. 1., pp.177-218. Academic Press, London.
- 菅原庸・水口忠久・石村美佐・藤原正嗣, 1993. 五ヶ所湾における赤潮発生と細菌相及び環境要因との関係—IV. マリンバイオテクノロジーによる赤潮被害防止技術開発試験, 平成4年度赤潮対策技術開発試験報告書, pp.46-64, 水産庁.
- 竹内俊博・水口忠久・石村美佐・菅原庸, 1992. 五ヶ所湾における赤潮発生と細菌相及び環境要因との関係—III. マリンバイオテクノロジーによる赤潮被害防止技術開発試験, 平成3年度赤潮対策技術開発試験報告書, pp.53-68, 水産庁.
- Tamaoka, J. and K. Komagata, 1984. Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.*, **25**, 125-128.
- Walsby, A.E., 1974a. The extracellular products of *Anabaena cylindrica* Lemm. I. Isolation of a macromolecular pigment peptide complex and other components. *Br. Phycol. J.*, **9**, 371-381.
- Walsby, A.E., 1974b. The extracellular products of *Anabaena cylindrica* Lemm. II. Fluorescent substances containing serine and threonine, and their role in extracellular pigment formation. *Br. Phycol. J.*, **9**, 383-391.
- Whitaker, D.R., F.D. Cook and D.C. Gillespie, 1965. Lytic enzymes of *Sorangium* sp. Some aspects of enzyme production in submerged culture. *Can. J. Biochem.*, **43**, 1927-1933.
- Whitaker, D.R., 1965. Lytic enzymes of *Sorangium* sp. Isolation and enzymatic properties of the α and β -lytic proteases. *Can. J. Biochem.*, **43**, 1935-1954.
- Whitaker, D.R., 1967. Simplified procedures for production and isolation of the bacteriolytic proteases of *Sorangium* sp.. *Can. J. Biochem.*, **45**, 991-993.

- Wingard, M., G. Matsueda and R.S. Wolfe, 1972. Myxobacter AL-1 protease II: specific peptide bond cleavage on the amino side of lysine. *J. Bacteriol.*, **112**, 940-949.
- 山口峰生, 1994. *Gymnodinium nagasakiense* の赤潮発生機構と発生予知に関する生理生態学的研究. 南西水研研報, **27**, 251-394.
- Yamamoto, Y and K. Suzuki, 1977. Ultrastructural studies on lysis of blue-green algae by a bacterium. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **23**, 285-295.
- 山本鎔子, 1978. 寒天重層法による湖沼中のラン藻溶解性生物因子の測定. 陸水学雑誌, **39**, 9-14.
- Yamamoto, Y., 1981. Observation on the occurrence of microbial agents which cause lysis of blue-green algae in Lake Kasumigaura. *Jpn. J. Limnol.*, **42**, 20-27.
- Yamamoto, Y and K. Suzuki, 1984. Light and electron microscopic observations on prey specificities of an algophorous amoeba from Japanese freshwaters. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **30**, 411-417.
- 山本鎔子, 1986. 藻のパソジーン. 藻類の生態, (秋山優・有賀祐勝・坂本充・横浜康継共編), pp.439-504, 内田老鶴圃, 東京.
- 山本鎔子, 1987. 分解生物. 水の華発生とその制御, (生嶋功編), pp.102-121, 東海大学出版会, 東京.
- 山本鎔子, 1988. 溶藻性微生物の種類と日本の湖沼, 河川における分布. 日本微生物生態学会報, **2**, 77-88.
- 山本鎔子・林秀剛・菅野徳彦, 1988. 汚染水域における溶藻性微生物の季節変動. 日本微生物生態学会報, **2**, 45-51.
- Yamamoto, Y and K. Suzuki, 1990. Distribution and algal-lysing activity of fruiting myxobacteria in Lake Suwa. *J. Phycol.*, **26**, 457-462.
- 山本鎔子・菅野徳彦・林秀剛, 1991. 木崎湖および諏訪湖底泥中の溶藻性微生物の分布. 藻類, **39**, 271-276.
- Yamamoto, Y., S. Niizuma, N. Kuroda and M. Sakamoto, 1993. Occurrence of heterotrophic bacteria causing lysis of cyanobacteria in a eutrophic lake. *Jpn. J. Phycol.*, **41**, 215-220.
- 柳哲雄・遠藤拓郎・西島敏隆・畑幸彦・門谷茂・岡市友利, 1987. 赤潮発生の物理・化学環境. 赤潮の科学, (岡市友利編), pp.149-210, 恒星社厚生閣, 東京.
- Yentsch, C.S. and D.W. Menzel, 1963. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and pheophytin by fluorescence. *Deep-sea Res.*, **10**, 221-231.
- Yoshinaga, I., T. Kawai and Y. Ishida, 1995a. Lysis of *Gymnodinium nagasakiense* by marine bacteria. In: Harmful marine algal bloom, (edited by P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien and C. Marcaillou), pp.687-692, Lavoisier publishing, Paris.
- Yoshinaga, I., T. Kawai, T. Takeuchi and Y. Ishida, 1995b. Distribution and fluctuation of bacteria inhibiting the growth of a marine red tide phytoplankton *Gymnodinium mikimotoi* in Tanabe Bay (Wakayama Pref., Japan). *Fish. Sci.*, **61**, 780-786.

- 吉永郁生・金武燦・今井一郎・板倉茂・長崎慶三・内田有恒・石田祐三郎, 1995. 広島湾における *Heterosigma akashiwo* 赤潮にともなうキラー細菌数の変動. 日本微生物生態学会第 11 回大会講演要旨集, pp.75.
- 吉永郁生・金武燦・今井一郎・内田有恒・石田祐三郎, 1995. 16SrRNA 遺伝子情報に基づく *Heterosigma akashiwo* キラー細菌の群集解析. 日本微生物生態学会第 11 回大会講演要旨集, pp.76.